

Virgínia Andreia Figueiredo Rodrigues

Licenciatura em Bioquímica

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO DE LIMPEZA DE
EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA
PRODUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE
DEXAMETASONA**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Prof^a Dra. Elvira Gaspar, UNL

Co-orientadores: Dr. António Bica, LEF

Dra. Paula Rato, LEF

Júri:

Presidente: Prof^a Doutora Paula Cristina de Sério Branco

Arguente(s): Prof^a Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes

Prof. Doutor Higuinaldo José Chaves das Neves

Abril 2013

“Desenvolvimento e Validação de Método de Limpeza de Equipamentos Utilizados na Produção de Comprimidos de Dexametasona” © Virgínia Rodrigues, FCT/UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

A concretização desta tese de mestrado foi a consequência do gosto pela minha actividade profissional no LEF, dentro do Departamento de Desenvolvimento e Validações de Métodos Analíticos, onde tenho oportunidade de contactar com profissionais empenhados e de excelente nível, colegas de grande camaradagem e conhecimento, que me proporcionam excelentes períodos de aprendizagem continua, os quais considero terem contribuído de forma decisiva para a minha evolução pessoal e profissional, e aos quais deixo aqui o meu agradecimento.

Um muito obrigado ao Dr. António Bica, pela oportunidade de realizar esta dissertação no LEF, por todas as facilidades concedidas durante o desenvolvimento deste projecto e pelas suas correcções.

O meu especial agradecimento à Professora Doutora Elvira Gaspar, por ter aceite a orientação deste trabalho, pela sua disponibilidade, opinião, revisão crítica e por todos os incentivos.

À Dra. Paula Rato, por tudo o que me ensinou, pela permanente disponibilidade sempre que solicitada e pela ajuda preciosa e fundamental na realização deste trabalho.

Agradecer também, ao Dr. João Correia, responsável pelo Departamento de Produção do LEF, por toda a abertura, disponibilidade e por ter tornado possível o desenvolvimento de todas as tarefas necessárias, com vista à realização dos objectivos deste projecto.

Agradeço a todos os que me são queridos por todo o apoio, carinho e paciência .

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento e validação de um método analítico para análise de resíduos, em equipamentos da produção farmacêutica, da substância activa dexametasona. O objectivo deste estudo consistiu na validação de um método analítico envolvendo o método cromatográfico HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) com detecção por ultra-violeta (UV), para a quantificação de resíduos de dexametasona no âmbito do processo de limpeza de equipamentos utilizados na produção de comprimidos de dexametasona. O método foi desenvolvido tomando como ponto de partida as condições definidas pelas farmacopeias, para a quantificação da substância activa e produto acabado. A validação do método foi realizada de acordo com as directrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH). Foram realizados testes de Selectividade, linearidade, exatidão, precisão e estabilidade. Não foi observada interferência de qualquer outro constituinte da amostra na análise, pelo que ficou demonstrado tratar-se de um método selectivo. O método apresenta uma resposta linear para uma gama de concentrações de 50% a 150% (100% \Leftrightarrow concentração de dexametasona de 0,56 $\mu\text{g/mL}$ e 0,65 $\mu\text{g/mL}$). Os testes de exatidão e precisão demonstraram que o método é rigoroso e através da avaliação da precisão do sistema, verificou-se que o sistema cromatográfico utilizado para a análise é preciso na gama de aplicação do método analítico. Tanto as soluções padrão como as amostras apresentaram uma estabilidade de pelo menos 72h nas condições ambientais normais (bancada) não protegidas da luz, em armazenamento a 5°C e nas condições de injeção analítica, protegidas da luz. O método apresentado mostrou ser robusto para volumes de injeção de 25 μL , fluxo de 1,0mL/min. e temperatura ambiente de coluna. Neste sentido, o método desenvolvido para avaliação de resíduos de substância activa, é adequado para a finalidade a que foi proposto, e portanto é válido para a referida análise.

PALAVRAS-CHAVE: método de validação de limpeza; equipamentos farmacêuticos multiuso; resíduos de dexametasona

ABSTRACT

An analytical methodology was developed and validated in order to be used for the evaluation of dexamethasone residues. The objective of this study was the validation of an analytical methodology involving High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) detection for the assay of dexamethasone residues, in the scope of equipment validation program of dexamethasone tablets. The method was developed using the conditions set by drug substance pharmacopeia as a starting point. The method validation was performed according to International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. Selectivity, linearity, accuracy, precision and stability tests were performed. There was no interference of any other constituent of the sample in active substance analysis, demonstrating that the method is selective. The method showed a linear response for a range of concentrations from 50% to 150% (100% \Leftrightarrow concentration of dexamethasone of 0.56 $\mu\text{g/mL}$ and 0.65 $\mu\text{g/mL}$). The accuracy and precision data demonstrated that the method is rigorous and it also showed that the chromatographic system is adequate. Standard solutions and samples showed to be stable at least 72 hours at room temperature (20-24°C) on the working bench, not protected from light, and also at 5°C and in the HPLC injector conditions, protect from light. The method proved to be robust for injection volumes of 25 μL , flow rate 1.0mL/min. and for column ambient temperature. So, the developed method for equipment's cleaning validation is adequate for the analysis, ensuring that the procedure removes residues of dexamethasone to a level of acceptance.

KEYWORDS: cleaning validation methodology; multipurpose pharmaceutical equipment; dexamethasone residues

ÍNDICE DE MATÉRIAS

ÍNDICE DE MATÉRIAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	V
ABREVIATURAS	VII
INTRODUÇÃO	1
1.1 Esteróides	7
1.1.1 Estrutura Química	7
1.1.1.1 Esteróides sintéticos (Corticosteróides)	8
1.1.2 Dexametasona	11
1.2 Informação da formulação farmacêutica	12
1.3 Validação de métodos analíticos	15
1.3.1 Selectividade	17
1.3.2 Gama de trabalho	18
1.3.3 Linearidade	18
1.3.4 Limite de detecção	19
1.3.5 Limite de quantificação	20
1.3.6 Exactidão	20
1.3.7 Precisão	21
1.3.7.1 Repetibilidade do sistema	22
1.3.7.2 Repetibilidade de análise	22
1.3.7.3 Precisão intermédia	23
1.3.7.4 Reprodutibilidade	23
1.3.8 Estabilidade das soluções	23
1.3.9 Adequabilidade do sistema (<i>System Suitability</i>)	24
1.3.10 Robustez	25
1.4 Limpeza na Industria farmacêutica	27
1.4.1 Definição do “pior caso” (<i>Worst Case</i>)	29
1.4.2 Delineamento do Procedimento de Limpeza	32
1.4.3 Métodos de amostragem em validação de limpeza	37
1.4.4 Determinação dos Critérios de Aceitação	41
1.5 Metodologia Analítica	45
1.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	46
1.5.2 Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC)	47
2.1 Preparação de comprimidos de dexametasona	53
2.1.1 Equipamentos	53
2.1.1.1 Limpeza do Misturador em V Filtra	54

2.1.1.2	Limpeza da máquina de comprimir RIVA PICCOLA	67
2.2	Desenvolvimento do método de validação de limpeza	75
2.2.1	Materiais e Equipamentos	75
2.2.2	Método analítico e Protocolo de soluções.....	77
2.2.2.1	Selectividade	77
2.2.2.2	Linearidade (0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL)	79
2.2.2.3	Limite de Quantificação	80
2.2.2.4	Limite de Detecção.....	80
2.2.2.5	Extração / Recuperação	80
2.2.2.6	Precisão.....	82
2.2.2.7	Estabilidade	83
2.2.2.8	System Suitability	83
3.1	Resultados obtidos no desenvolvimento e validação do Método Analítico	87
3.1.1	Desenvolvimento do Método Analítico	87
3.1.2	Validação do Método Analítico	91
3.1.2.1	Selectividade	91
3.1.2.2	Linearidade e gama de trabalho.....	95
3.1.2.3	Limite de detecção	99
3.1.2.4	Limite de Quantificação	100
3.1.2.5	Exatidão.....	102
3.1.2.6	Precisão.....	103
3.1.2.7	Estabilidade	106
3.1.2.8	Testes de <i>System Suitability</i>	108
3.1.3	Avaliação da limpeza de equipamentos (Recolha de amostras)	108
3.1.4	Resultados obtidos por determinação de carbono orgânico total (TOC).....	110
3.1.5	Avaliação da limpeza de agente de limpeza - Recolha de amostras no Misturador em V	114
	BIBLIOGRAFIA.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Estrutura química básica dos esteróides e respectiva numeração.....	7
FIGURA 1.2 - Relação entre estrutura e actividade terapêutica dos corticosteróides	9
FIGURA 1.3 - a) Estrutura química da prednisolona; b) cortisol; c) 11-deoxicorticosterona	10
FIGURA 1.4 - Estrutura molecular de dexametasona; a) bidimensional e b) tridimensional.....	11
FIGURA 1.4 - Esquema representativo do conceito de validação.....	15
FIGURA 1.5 - Método da razão sinal/ruído (S/R)	19
FIGURA 1.6 - Exemplo de um <i>swab</i>	37
FIGURA 1.7 - Exemplo do movimento do <i>swab</i>	38
FIGURA 1.8 - Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC)	47
FIGURA 2.1 - Fluxograma simplificado do processo de fabrico de comprimidos de dexametasona	53
FIGURA 2.2 - Imagem do equipamento Misturador em V Filtra utilizado na validação	55
FIGURA 2.3 - A. Anel de descarga (Aço inox); B. Tampas de silicone (Silicone); C. Friso da tampa de descarga (Aço inox)	57
FIGURA 2.4 - Imagem do equipamento Máquina de comprimir RIVA PICCOLA utilizado na validação	67
FIGURA 2.5 - Estrelas (Aço inox); B. Cavidade das matrizes (Aço inox); C. Anel de ligação da tremonha ao distribuidor (Aço inox); D. Raspadores do distribuidor (Aço inox); E. Prato (Aço inox)	70
FIGURA 2.6 - Amostra de a) aço inox e b) tampa de silicone	76
FIGURA 2.7 - Esquema de amostragem com <i>swab</i>	81
FIGURA 3.1 – Cromatogramas correspondentes ao ensaio de Selectividade.....	95
FIGURA 3.2 –Representação gráfica da recta de calibração de dexametasona tendo em conta a concentração de trabalho 0,56 µg/mL.....	96
FIGURA 3.3– Representação gráfica da recta de calibração de dexametasona tendo em conta a concentração de trabalho 0,65 µg/mL.....	97
FIGURA 3.4 –Cromatogramas correspondentes às soluções de dexametasona, preparadas para o ensaio de linearidade	98
FIGURA 3.5 – Cromatograma correspondente a uma solução preparada à concentração de LOD	100
FIGURA 3.6 –Cromatograma correspondente a uma solução preparada à concentração de LOQ	101
FIGURA 3.7 - Resíduos de dexametasona por amostra recolhida, após o procedimento de limpeza do Misturador em V.....	109

FIGURA 3.8 - Resíduos de dexametasona por amostra recolhida, após o procedimento de limpeza da máquina de comprimir	110
FIGURA 3.9 - Curva de calibração do aparelho de TOC.....	111
FIGURA 3.10 - Gráfico de concentração de agente de limpeza versus mg C/L (TOC)	112

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1 - Actividade de alguns corticosteróides	11
TABELA 1.2 -Propriedades físico-químicas da dexametasona	12
TABELA 1.3 - Esquema terapêutico de dosagem da dexametasona na prevenção de náuseas e vômitos induzidos por quimioterapia	13
TABELA 1.4 - Composição qualitativa e quantitativa dos comprimidos de Dexametasona a 1mg/comp.....	14
TABELA 1.5 - Composição qualitativa e quantitativa dos comprimidos de Dexametasona a 2mg/comp.....	14
TABELA 1.6 - Composição qualitativa e quantitativa dos comprimidos de Dexametasona a 4mg/comp.....	14
TABELA 1.7 - Composição qualitativa e quantitativa dos comprimidos de Dexametasona a 8mg/comp.....	14
TABELA 1.8 - Exigências de validação dos métodos analíticos de acordo com a ICH	17
TABELA 1.9 - Gama de trabalho.....	18
TABELA 1.10 - Soluções a preparar para avaliação da linearidade.....	18
TABELA 1.11 - Soluções a preparar para avaliação da exactidão.....	21
TABELA 1.12 - Soluções a preparar para avaliação da repetibilidade de análise	22
TABELA 1.13 - Testes de adequabilidade do sistema.....	24
TABELA 1.14 - Critérios de aceitação a para validação analítica do método de limpeza	26
TABELA 1.15 - Categorias referentes ao critério de solubilidade.....	30
TABELA 1.16 - Categorias referentes ao critério de actividade	30
TABELA 1.17 - Categorias referentes ao critério de toxicidade	31
TABELA 1.18 - Resumo de principais ingredientes activos utilizados em produção no LEF	31
TABELA 1.19 - Comparação de limpeza manual e automática.....	34
TABELA 1.20 - Vantagens e desvantagens de métodos de amostragem	40
 TABELA 2.1 - Propriedades físico-químicas do detergente P3-cosa PUR 80	 54
TABELA 2.2 - Áreas do Misturador em V a ser amostradas	57
TABELA 2.3 - Dados necessários para cálculo dos limites de aceitação.....	60
TABELA 2.4 - Tabela de cálculo do limite de aceitação para o activo	60
TABELA 2.5 - Dados necessários para cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza	63
TABELA 2.6 - Cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza num processo de enxaguamento.....	64
TABELA 2.7 - Cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza num processo de amostragem por swab.....	64

TABELA 2.8 - Resumo dos limites de aceitação	66
TABELA 2.9 - Áreas da máquina de comprimir a serem amostradas	69
TABELA 2.10 - Dados necessários para cálculo do limite de aceitação	70
TABELA 2.11 - Tabela de cálculo de concentração de activo	71
TABELA 2.12 - Dados necessários para cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza	72
TABELA 2.13 - Cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza num processo de <i>swab</i>	73
TABELA 2.14 - Resumo dos limites de aceitação	74
TABELA 3.1 - Resultados obtidos em estudos de recuperação de 0,56 µg/mL de substância activa em placa aço inox	90
TABELA 3.2 - Resultados obtidos em estudos de recuperação de 0,65 µg/mL de substância activa em placa silicone	91
TABELA 3.3 - Selectividade	92
TABELA 3.4 - Parâmetros de Linearidade; Concentração de trabalho 0,56 µg/mL	95
TABELA 3.5 - Parâmetros de Linearidade; Concentração de trabalho 0,65 µg/mL	96
TABELA 3.6 - Concentração de LOD e respectivas áreas	99
TABELA 3.7 - Limite de quantificação	100
TABELA 3.8 - Exatidão	102
TABELA 3.9 - Repetibilidade de sistema	103
TABELA 3.10 - Repetibilidade de análise	104
TABELA 3.11 - Precisão Intermédia	105
TABELA 3.12 - Estabilidade de Soluções em placa aço inox e silicone	106
TABELA 3.13 - Estabilidade em placas à temperatura ambiente, protegidas da luz durante 3 dias	107
TABELA 3.14 - Testes de <i>system suitability</i>	108
TABELA 3.15 - Resultados obtidos após recolha de amostras do Misturador em V	109
TABELA 3.16 - Resultados obtidos após recolha de amostras na Máquina de Comprimir	109
TABELA 3.17 - Conversão do critério calculado	113
TABELA 3.18 - Precisão	113
TABELA 3.19 - Recuperação em soluções de agente de limpeza	114
TABELA 3.20 - Resultado obtido numa amostra de enxaguamento recolhida no equipamento Misturador em V	114

ABREVIATURAS

ANF	Associação Nacional de Farmácias
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
ASOC	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
BPF	Boas Práticas de Fabrico
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CBER	<i>Center for Biologics Evaluation and Research</i>
CDER	<i>Center for Drug Evaluation and Research</i>
CINV	<i>Chemotherapy Induced Nausea and Vomiting</i>
CV	Coeficiente de variação
CVMP	Plano Mestre de Validação de Limpeza
DA, CQ & VAL	Departamento de Desenvolvimento Analítico, Controlo de Qualidade e Validação
EDQM	<i>European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare</i>
EMA	Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos
EP	<i>European Pharmacopeia</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
I&D	Investigação & Desenvolvimento
IC	Carbono inorgânico (<i>Inorganic carbon</i>)
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
INFOSAÚDE	Instituto de Formação e inovação em Saúde
ISO	Organização Internacional para a Padronização (<i>International Organization for Standardization</i>)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LEF	Laboratório de Estudos Farmacêuticos
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
Swab	Instrumento constituído por uma cabeça ligada a uma haste de plástico. A cabeça do swab é constituída por um material fibroso e é usada para limpar a superfície que se pretende amostrar.

TC	Carbono total (<i>Total carbon</i>)
TOC	Carbono Orgânico Total (<i>Total organic carbon</i>)
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultra-violeta
WHO	<i>World Health Organization</i>

INTRODUÇÃO

A competitividade tecnológica é fundamental para a sobrevivência de qualquer empresa. É importante demonstrar que os seus produtos estão dentro dos padrões de qualidade nacionais e internacionais, podendo assim estabelecer alianças tecnológicas para o desenvolvimento e incorporação de novos produtos importantes, por exemplo, para as acções de saúde pública.

Nos últimos anos houve um grande avanço na implementação de programas de qualidade na indústria farmacêutica. Produzir com maior qualidade e menor custo são palavras de ordem para sobreviver e enfrentar a concorrência. É importante que os produtos sejam produzidos correctamente desde o início, reduzindo a variabilidade das características de qualidade no processo produtivo, de modo a aumentar a confiança no produto final. Essas acções são fundamentais para alcançar a estabilidade e melhorar a capacidade de qualquer processo de produção. Citando António Bica (Infarmed, 2009), "...a melhor estratégia para garantir e salvaguardar a qualidade, reside em privilegiar critérios de competência, de desenvolvimento tecnológico, qualificação de recursos humanos e de implementação de práticas efectivas de gestão e garantia da qualidade no fabrico de medicamentos, genéricos ou inovadores."

É interessante verificar que esta atitude de melhoria e de focalização no aumento da eficiência tem sido fomentada pelas entidades reguladoras da indústria farmacêutica, quer a nível internacional quer a nível nacional como, por exemplo, a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América e a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED) em Portugal. A qualidade observou diferentes abordagens ao longo do tempo, sendo até hoje factor chave de sucesso. O objectivo de um sistema da qualidade é garantir que os produtos estejam adequados ao seu uso indicado. A validação é uma das ferramentas essenciais para encontrar a qualidade total, pois a sua aplicação garante a confiança da utilidade, instalações, dos equipamentos e, principalmente, dos processos de produção, seja no sector farmacêutico ou em qualquer outra área. A validação garante a robustez dos processos produtivos e desta forma diminui os riscos de desvio de qualidade e os riscos da não conformidade aos requisitos estabelecidos (Organização Mundial de Saúde - OMS, 2006).

A validação de limpeza de equipamentos é requisito imprescindível para garantir que os produtos tenham a eficácia e segurança esperada. Trata-se de um processo utilizado para verificar se os procedimentos de limpeza de equipamentos removem efectivamente os resíduos existentes num critério de aceitação definido, garantindo que, após a limpeza dos equipamentos, o próximo produto fabricado não contém nenhuma contaminação de produto e/ou agente de limpeza anteriores, isto é, que não há contaminação cruzada. As entidades reguladoras exigem que as indústrias realizem os diferentes tipos de validação; porém, as suas normas e requisitos não são claros nos procedimentos a realizar para uma validação

específica. Existem poucos guias explicativos para este assunto devido à grande variedade de processos produtivos, fazendo com que cada um seja validado através de diferentes procedimentos e análise de dados. Além disso, há a falta de padronização da linguagem do sector de validação, o que cria uma barreira para o entendimento total dos termos (ATHAIDE, 2000).

O Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) conota-se como uma empresa inovadora, constituída para garantir a qualidade dos produtos farmacêuticos e contribuir para o desenvolvimento científico na área do medicamento em Portugal. Assim, segundo a premissa da melhoria na qualidade, o presente trabalho pretende funcionar como uma proposta de valor e confirmação do LEF como um dos laboratórios em franca expansão com base na qualidade, segurança e eficácia de base científica.

O objectivo principal deste trabalho foi estudar os procedimentos e técnicas visando desenvolver uma metodologia analítica para a validação da limpeza de equipamentos multiuso, utilizados na produção de comprimidos de dexametasona, de forma a garantir que os mesmos possam ser posteriormente utilizados, com segurança, sem que ocorra contaminação cruzada.

Foram determinados os seguintes objectivos específicos:

- Foi seleccionada, através da avaliação de solubilidade, a substância activa considerada “pior caso”, para ser utilizada como referência na validação de limpeza. Se o procedimento de limpeza realizado for eficiente para remoção do activo de menor solubilidade também será capaz de remover um outro activo de solubilidade superior;
- Foram definidos os pontos e métodos de amostragem, a área compartilhada pelos produtos e os critérios de aceitação para serem utilizados na validação deste processo de limpeza;
- Foram realizados, através de ensaios em laboratório, os estudos de recuperação da substância activa e do agente de limpeza, bem como os procedimentos de amostragem específicos;
- Foi elaborada a proposta de um método analítico, suficientemente robusto, para ser utilizado na análise de rotina de amostras provenientes da limpeza dos equipamentos Misturador em V e da Máquina de Comprimir.
- Foram iniciados os estudos relativamente à validação do agente de limpeza.

APRESENTAÇÃO DA EMPRESA (LEF)

O Laboratório de Estudos Farmacêuticos, LEF, está situado na Rua das Ferrarias Del Rei, N.º 6, Urbanização da Fábrica da Pólvora, Barcarena (Oeiras).

Foi criado em Novembro de 1992 pelas Farmácias de Oficina Portuguesas através da sua Associação Nacional de Farmácias (ANF), com a denominação “Laboratório de Estudos Farmacêuticos”, desenvolvendo a sua actividade essencialmente na área farmacêutica. Em 2006, foi criada a sociedade INFOSAÚDE – INSTITUTO DE FORMAÇÃO E INOVAÇÃO EM SAÚDE UNIPESSOAL, LDA, entidade juridicamente autónoma, participada a 100% pela ANF e da qual faz parte o LEF.

Actualmente, a designação “LEF” constitui uma marca registada, que identifica no universo de empresas da INFOSAÚDE, a única que se dedica às actividades de investigação científica e de desenvolvimento tecnológico no domínio do medicamento (www.lef.pt). A actividade do LEF desenvolve-se em duas vertentes: Investigação & Desenvolvimento e Prestação de Serviços. Estas vertentes encontram-se repartidas pelos vários departamentos, sendo de referir especificamente:

- Departamento de Produção, que dispõe de uma unidade piloto para o desenvolvimento e produção de lotes experimentais, lotes piloto e lotes para comercialização de formas sólidas, semi-sólidas e líquidas não estéreis.
- Departamento de Desenvolvimento Analítico, Controlo de Qualidade e Validação (DA CQ&VAL), que abrange estudos em medicamentos e outros produtos farmacêuticos, dispositivos médicos e matérias-primas de origem sintética ou de origem natural.

O LEF possui também, uma componente de prestação de serviços de formação e consultoria técnica ao abrigo das Boas Práticas de Fabrico (BPF), Boas Práticas de Laboratório (BPL), Sistemas da Qualidade, área regulamentar e farmacovigilância ao sector farmacêutico, assim como a outras áreas, tais como a alimentar e a de produtos cosméticos e de higiene corporal.

O LEF presta serviços aos vários sectores de actividade na área farmacêutica, designadamente às entidades oficiais, à indústria farmacêutica, aos farmacêuticos de oficina, aos farmacêuticos hospitalares, à classe médica e às instituições de I&D nacionais e estrangeiras que operam na área da saúde.

A política de gestão do LEF tem como objectivos fundamentais a satisfação dos clientes internos e externos, a qualidade dos serviços prestados (de acordo com GMP) e a apresentação de resultados fiáveis, cumprindo rigorosamente os requisitos legais e regulamentares aplicáveis (como entidade certificada) e procurando continuamente a melhoria do desempenho ambiental.

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Esteróides

Os esteróides são, provavelmente, um dos grupos de produtos naturais mais investigados nas últimas décadas, estando estes largamente distribuídos na natureza. Os organismos vivos, tanto animais como vegetais, contêm esteróides, os quais desempenham um importante papel na sua actividade vital, tendo funções muito variadas nomeadamente como reguladores fisiológicos (Schroepfer *et al.*, 2000; Lemke *et al.*, 2002), hormonas (Lemke *et al.*, 2002), provitaminas (Williams *et al.*, 2002), entre outras. Neste grupo de compostos incluem-se, por exemplo, as hormonas sexuais (Ex: testosterona e progesterona) (Lemke *et al.*, 2002), as hormonas adrenocorticais (Ex: cortisona e aldosterona) os glicósidos cardiotónicos, os ácidos biliares (Lemke *et al.*, 2002), os neurosteróides (Belelli *et al.*, 2005) e outros. Estas hormonas esteróides estão agrupadas em três classes gerais, consoante a sua acção:

- 1) aquelas que actuam a nível do equilíbrio do sódio e do potássio, designados por mineralocorticóides (exemplo: aldosterona);
- 2) as que actuam por regulação do metabolismo das proteínas, hidratos de carbono e lípidos, designados por glucocorticóides (exemplo: cortisol);
- 3) os androgénios ou estrogénios, que actuam primariamente sobre as características sexuais secundárias em órgãos alvo específicos.

Os esteróides são substratos funcionalizáveis utilizados na indústria farmacêutica como materiais de partida para a síntese, por vias químicas e microbiológicas de muitas moléculas biologicamente activas. (Lednicer, 2009).

1.1.1 Estrutura Química

Todos os esteróides possuem um anel ciclopentanoperhidrofenantreno que os caracteriza como núcleo químico, sendo os anéis de seis membros denominados A, B, C e o de cinco membros denominado D (Figura 1.1). A designação do núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno resulta do facto de este núcleo poder ser entendido como um ciclopentano ligado a um fenantreno saturado (perhidrofenantreno) (BERG *et al.*, 2007).

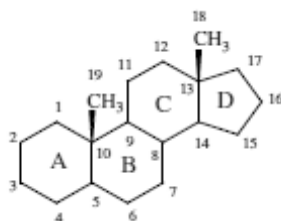


FIGURA 1.1 - Estrutura química básica dos esteróides e respectiva numeração

Existe uma grande variedade de formas isoméricas dos esteróides, devido à união dos anéis A e B, que podem existir na configuração *trans* ou *cis*. Já os estrogénios não apresentam esta forma de isomeria porque o seu anel A é aromático (BERG *et al.*, 2007).

Estruturalmente, os esteróides possuem grupos polares, hidroxilo ou cetona conjugada, na posição 3 (anel A) e alguns apresentam também uma cadeia lateral hidroxicetónica na posição 17 (anel D). Grupos cetona e hidroxilo são também comuns na posição 11 (anel C). Alguns esteróides sintéticos apresentam substituição na posição 16; é o caso da dexametasona (R = OH).

Os esteróides são moléculas complexas, podendo as reacções estereosselectivas ser importantes. O facto destes compostos terem vários centros quirais possibilita, por vezes, a obtenção de produtos isomericamente enriquecidos através de reacções químicas relativamente simples. Além disso, como estas moléculas têm vários grupos funcionais susceptíveis de ataque oxidativo e de outros tipos de reacções, o estudo das transformações regio- e quimiosselectivas assume elevada importância.

1.1.1.1 Esteróides sintéticos (Corticosteróides)

Ao longo das últimas décadas, centenas de esteróides foram isolados de fontes naturais e vários milhares foram obtidos por via sintética. Este interesse mantém-se actualmente, havendo intensa investigação no sentido de isolar e identificar novos esteróides (naturais) com novas actividades biológicas (Lee *et al.*, 2004). Muitos esteróides sintéticos são usados na terapêutica de diversas patologias, como cancros hormono-dependentes (Hoffmann *et al.*, 2005; Nussbaumer *et al.*, 2004), nomeadamente os inibidores da aromatase no tratamento endócrino do cancro da mama (Séralini *et al.*, 2001), e os esteróides com actividade antiandrogénica no tratamento endócrino do cancro da próstata (Tamella *et al.*, 2004). Diversos estrogénios, progestagénios e outros esteróides são usados em terapêuticas de problemas hormonais variados (Lemke *et al.*, 2012). Muito conhecidos são também os esteróides sintéticos utilizados como contraceptivos orais, os corticosteróides anti-inflamatórios (Lemke *et al.*, 2012), os esteróides anabolizantes (Orr *et al.*, 2004), os neurosteróides (Gasior *et al.*, 1999) e os ácidos biliares (Virtanen *et al.*, 2004).

Devido ao extenso uso de esteróides sintéticos (corticosteróides), tem sido desenvolvida muita pesquisa na tentativa de sintetizar derivados que apresentem aumento das propriedades terapêuticas, acção biológica e terapêutica mais específica, limitações dos efeitos adversos e maior eficácia. As modificações estruturais efectuadas na molécula têm como objectivo:

- o aumento da afinidade do análogo de esteróides para a proteína receptora no citosol;
- o aumento da capacidade do complexo esteróide-receptor para agir a nível celular;
- a degradação mais lenta no organismo.

As modificações da estrutura, no caso específico da hidrocortisona, resultaram em aumentos na razão da actividade anti-inflamatória *versus* retentora de sódio, de tal modo que,

em vários derivados actualmente disponíveis, os efeitos eletrolíticos adversos não têm consequências sérias, mesmo quando estes derivados são administrados em doses altas. Estas alterações na estrutura molecular modificam o potencial farmacológico, como resultado das alterações na absorção, na ligação proteica, na taxa de transformação metabólica, na taxa de excreção, na capacidade de atravessar membranas e na eficácia intrínseca da molécula no seu local de acção (Lednicer, 2009).

Estas modificações estruturais dos esteróides, com o objectivo de aumentar a actividade anti-inflamatória podem, frequentemente, levar a novas propriedades indesejáveis, tais como o efeito retentor de sódio (no caso de derivados halogenados) e mascaramento dos processos infecciosos, osteoporose, astenia, abaixamento do limiar cerebral, etc. Na Figura 1.2, podemos ver quais as modificações estruturais mais significativas como agentes terapêuticos. Representados por linhas escuras e símbolos químicos encontram-se os locais moleculares possíveis de alteração.

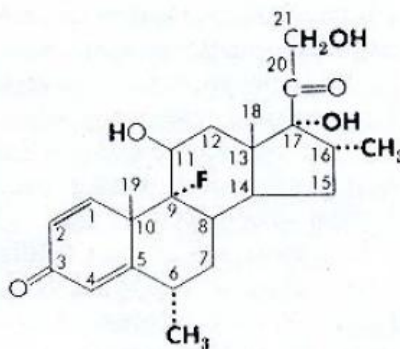


FIGURA 1.2 - Relação entre estrutura e actividade terapêutica dos corticosteróides. A **bold** indicam-se modificações que alteram a actividade. (De Liddle, 1961)

ANEL A: A ligação dupla 4,5 e a 3-cetona são, ambas, necessárias para a actividade adrenocorticosteróide típica. A introdução de uma ligação dupla 1,2 como por exemplo na prednisolona, aumenta a razão da actividade reguladora de hidratos de carbono *versus* retenção de sódio. Além disso, a prednisolona é metabolizada mas lentamente que o cortisol.

ANEL B: A introdução de uma dupla-ligação 1-2, a metilação na posição 6 ou a halogenação, modificam a actividade anti-inflamatória. A substituição 6 α tem efeitos imprevisíveis. No caso particular do cortisol, a metilação 6 α - aumenta o efeito anti-inflamatório, a eliminação de nitrogénio e a retenção de sódio nos seres humanos. A introdução de flúor na posição 9 α - acentua todas as actividades biológicas dos corticosteróides, aparentemente pelo seu efeito de retirada de electrões no grupo 11 β -hidroxilo.

ANEL C: A oxigenação em C-11 é indispensável para uma actividade anti-inflamatória significativa e reguladora de hidratos de carbono, mas não é necessária para elevar a actividade retentora de sódio, como ilustra a desoxicorticosterona.

ANEL D: A metilação ou hidroxilação em C-16 elimina o efeito de retenção de sódio, mas modifica muito ligeiramente o metabolismo e a actividade anti-inflamatória.

Todos os esteróides anti-inflamatórios actualmente usados são compostos 17 α -hidroxilo, embora alguns efeitos reguladores de carboidratos e anti-inflamatórios possam ocorrer em compostos 17-desoxi; a expressão máxima dessas actividades requer a presença do substituto 17 α -hidroxilo (Lednicer, 2009).

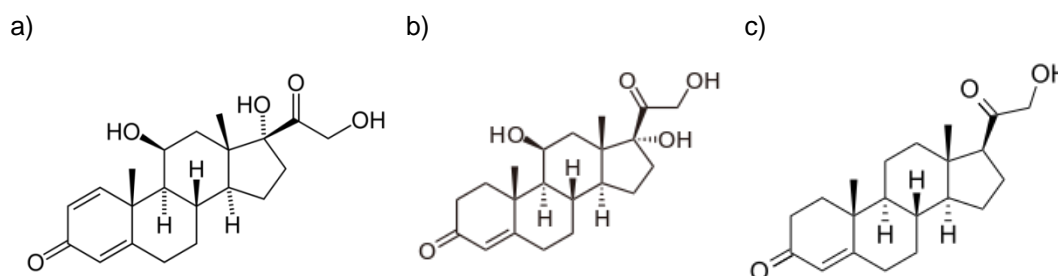


FIGURA 1.3 - a) Estrutura química da prednisolona; b) cortisol; c) 11-deoxicorticosterona

O mecanismo de acção destes corticosteróides é semelhante ao dos compostos naturais e as suas diferenças de actividade devem-se principalmente ao aumento da semi-vida e retardamento da sua catabolização ao nível hepático (Lemke, 2012). A título de ilustração, a semi-vida da hidrocortisona é de 90 minutos e a dos análogos sintéticos, como a dexametasona, é de 200 minutos.

O organismo tem mais dificuldade em metabolizar e eliminar os corticosteróides sintéticos, por isso, estes possuem efeito mais prolongado e actividade elevada. Provavelmente, a molécula modificada tem menos tendência a ser fixada pelos sistemas enzimáticos presentes. Desta forma, o início da sua actividade é imediato, porém a duração da acção varia, dependendo do fármaco. A tabela 1.1 mostra que as actividades da hidrocortisona e da cortisona são de duração curta e requerem doses fraccionadas várias vezes ao dia para manter o efeito.

TABELA 1.1 - Actividade de alguns corticosteróides (segundo Goodman & Gilman)

Dose equivalente aproximada (mg)		Actividade relativa à acção da Hidrocortisona		Plasma Semi-vida (minutos)	Duração da acção (horas)
		Anti-Inflamatória	Mineral-Corticoide		
Acção Curta					
Hydrocortisona (Cortisol)	20	1	1	90	8-12
Cortisona	25	0,8	0,8	30	8-12
Acção Intermédia					
Prednisona	5	4	0,8	60	12-36
Prednisolona	5	4	0,8	200	12-36
Triancinolona	4	5	0	300	12-36
Metilprednisolona	4	5	0,5	180	12-36
Acção Prolongada					
Dexametasona	0,75	30	0	200	36-54
Betametasona	0,6	30	0	300	36-54
Mineralocorticoide					
Fludrocortisona	0	15	150	240	24-36
Aldosterona	0	0	400 +	20	- -

1.1.2 Dexametasona

A dexametasona, (9 α -fluor-11 β ,17 α ,21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona; IUPAC (1979)), é um potente esteróide sintético, amplamente utilizado pelas suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras e utilizado principalmente no tratamento de doenças do colagénio, artrite, asma brônquica (Klassen *et al.*, 1997, Cross *et al.*, 2011), inflamações oculares (Civiale *et al.*, 2004; MOHAN *et al.*, 2001) e das doenças que decorrem de reacções imunes indesejáveis, como a rejeição de transplante de órgãos.

Esta molécula difere do seu análogo, a cortisona, somente pela presença de uma dupla ligação entre os átomos de carbono 1 e 2, o que altera as suas actividades farmacológicas.

A actividade anti-inflamatória e a capacidade retentora de sódio da dexametasona são mostradas na tabela 1.1, onde se verifica que este corticoesteróide tem um metabolismo mais lento que o da hidrocortisona, favorecendo o aumento da actividade anti-inflamatória.

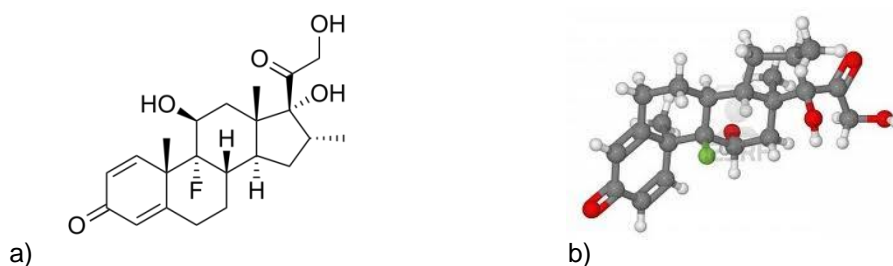


FIGURA 1.4 - Estrutura molecular de dexametasona; a) bidimensional e b) tridimensional

TABELA 1.2 - Propriedades físico-químicas da dexametasona

Propriedade físico-química	
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
Peso molecular	392,5 g/mol
Ponto de Fusão	262°C
Solubilidade a 25°C	89mg/L

A dexametasona apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco ou quase branco. É praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol e pouco solúvel em cloreto de metileno (AHFS Drug information, 2001; CHEMIDplus).

1.2 INFORMAÇÃO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

A dexametasona, à semelhança dos restantes corticosteróides, é rapidamente absorvida quando administrada por via oral, apresentando uma biodisponibilidade de 80-90%. A dexametasona tem uma dupla ligação entre C4-C5 e um grupo cetona no carbono C3, sendo biotransformada por enzimas de fase I, envolvendo a adição sequencial de átomos de oxigénio e hidrogénio, seguida de reacções de conjugação formando derivados solúveis em água. A redução da dupla ligação entre C4-C5 ocorre tanto no fígado como noutros locais, formando compostos inactivos. A redução da cetona em C3 para formar o derivado 3-hidroxil formando um tetrahydrocortisol, ocorre unicamente no fígado. Estes compostos com o anel A reduzido são conjugados pelo 3-hidroxil com sulfatos e glucoronídeos por reacções enzimáticas que ocorrem no fígado e em menor grau no rim. Os esteres de sulfatos e glucoronídeos são solúveis em água e são os metabolitos predominantemente excretadas na urina. A dexametasona é indutora do Citocromo P450, mais especificamente da isoforma CYP3A4. (Klassen *et al.*, 2001; Hardman *et al.*, 2001) sendo eliminada por via renal, com uma semi-vida de eliminação entre 36 e 54 horas.

A dexametasona administrada por via oral é utilizada em situações clínicas de quimioterapia leve a moderadamente emetogénica, de modo isolado ou em associação com outros antieméticos (Martindale, 2006; British National Formulary).

Não está completamente esclarecido o mecanismo de acção deste fármaco, relativamente ao efeito terapêutico mencionado, sendo de admitir a interacção com as prostaglandinas cerebrais. Na prevenção das náuseas e vômitos induzidos por quimioterapia (CINV), as recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASOC), relativamente aos esquemas terapêuticos estão descritas na Tabela 1.3

TABELA 1.3 - Esquema terapêutico de dosagem da dexametasona na prevenção de náuseas e vômitos induzidos por quimioterapia

DOSAGEM	RISCO
12mg no primeiro dia de tratamento, seguidos de 8mg diários do segundo ao quarto dia, associada a antagonista dos receptores NK1	em caso de alto risco emético
Dosagem única de 12mg	em caso de médio risco emético
Dosagem única de 8mg	em caso de baixo risco emético

O medicamento manipulado preparado, apresenta como substância activa a dexametasona e como excipientes a croscarmelose e uma mistura de excipientes de designação comercial Prosolv Easytab SP.

A croscarmelose é um excipiente frequentemente utilizado no fabrico de comprimidos, por compressão directa. Tem uma acção desagregante e nos comprimidos de dexametasona apresenta uma concentração de 4%.

O Prosolv Easytab SP, marca registada da JRS Pharma GMBH & Co, é uma mistura comercial de excipientes para compressão directa constituída pelos seguintes componentes:

- celulose microcristalina, diluente com densidade aparente de 320 g/L e tamanho médio de partícula de 100 µm. Presente na mistura na percentagem de 95,0 a 98,0%;
- amido sódico glicosado, desagregante com densidade aparente de 730 g/L e tamanho de partícula de 50 µm. Presente na mistura na percentagem de 0,5 a 2,0%;
- dióxido de silício coloidal, agregante com densidade aparente de 40 g/L e tamanho médio de partícula de 12 nm. Presente na mistura na percentagem de 1,5 a 2,5%;
- estearil fumarato de sódio, lubrificante com densidade aparente de 240 g/L e tamanho médio de partícula de 10 µm. Presente na mistura na percentagem de 0,3 a 1,0%;
- estearil fumarato de sódio, lubrificante com densidade aparente de 240 g/L e tamanho médio de partícula de 10 µm. Presente na mistura na percentagem de 0,3 a 1,0%.

O medicamento apresenta-se sob a forma de comprimidos doseados a 1 mg, 2 mg, 4 mg e 8 mg. A composição qualitativa e quantitativa das diferentes dosagens é apresentada nas tabelas seguintes.

TABELA 1.4 - Composição qualitativa e quantitativa dos comprimidos de Dexametasona a 1mg/comp.

Matérias-Primas	Quantidade	%	Função
Dexametasona	1,0 mg	1%	Substância activa
Croscarmelose sódica	4,0 mg	4%	Excipiente
Prosolv Easytab SP	95,0 mg	95%	Excipiente

TABELA 1.5 - Composição qualitativa e quantitativa dos comprimidos de Dexametasona a 2mg/comp.

Matérias-Primas	Quantidade	%	Função
Dexametasona	2,0 mg	2%	Substância activa
Croscarmelose sódica	4,0 mg	4%	Excipiente
Prosolv Easytab SP	94,0 mg	94%	Excipiente

TABELA 1.6 - Composição qualitativa e quantitativa dos comprimidos de Dexametasona a 4mg/comp.

Matérias-Primas	Quantidade	%	Função
Dexametasona	4,0 mg	4%	Substância activa
Croscarmelose sódica	4,0 mg	4%	Excipiente
Prosolv® Easytab SP	92,0 mg	92%	Excipiente

TABELA 1.7 - Composição qualitativa e quantitativa dos comprimidos de Dexametasona a 8mg/comp.

Matérias-Primas	Quantidade	%	Função
Dexametasona	8,0 mg	8%	Substância activa
Croscarmelose sódica	4,0 mg	4%	Excipiente
Prosolv Easytab SP	88,0 mg	88%	Excipiente

Estão disponíveis no mercado diversas dosagens de comprimidos de dexametasona, contudo o regime terapêutico exige ao clínico a existência de comprimidos doseados a 1mg, 2mg, 4mg e 8mg. Deste modo, e no sentido de satisfazer as exigências em termos hospitalares, o LEF optou pelo desenvolvimento das referidas dosagens.

1.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Segundo FDA (1987) (FDA – *Guidelines on General Principles of Process Validation*), validação é o procedimento que estabelece evidência documentada com um alto grau de confiança, de que um processo específico produzirá com consistência um produto, de acordo com suas especificações pré-definidas e atributos da qualidade. O conceito para validação de processo segundo EP(CPMP/QWP/846/96; EMEA/CVMP/598/99 - *Note for Guidance on Process Validation*) é similar ao descrito no ICH Q7 (2000). A Figura 1.5 representa este conceito, onde a validação de processo é a evidência documentada de que através deste processo se pode demonstrar que o método analítico em causa é adequado para a análise de um determinado analito numa certa matriz a um determinado nível de concentração, levando a resultados fiáveis, com boa exactidão e precisão.



FIGURA 1.5 - Esquema representativo do conceito de validação

Na indústria farmacêutica, a fiabilidade dos resultados analíticos é crucial para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia dos fármacos. Por este motivo, ao longo de muitos anos foram publicadas várias exigências regulamentares. A primeira conferência sobre o tema “*Analytical Methods Validation*” foi realizada em Washington em 1990. Esta conferência, que reuniu pela primeira vez cerca de 500 cientistas de todo o mundo, resultou na elaboração de um relatório onde se sistematizaram os princípios orientadores e recomendações a aplicar na validação dos métodos analíticos. Este diálogo construtivo entre autoridades reguladoras e indústria, surgiu a fim de harmonizar as exigências entre a Europa, os Estados Unidos da América e Japão. Um dos primeiros tópicos dentro da secção da qualidade foi a validação analítica e a referida *International Conference on Harmonization* (ICH) foi muito útil nos termos da harmonização e nas definições (Ermer, 2005) assim como na determinação das exigências básicas (ICH, 1995).

A validação embora possa ser uma actividade algo complexa e exigente, é necessária, pois as consequências de um método não validado traduzem-se num desperdício de tempo, dinheiro e recursos, uma vez que os resultados obtidos não apresentam fiabilidade. A validação é um processo moroso, mas vital na garantia da qualidade de um processo analítico desenvolvido. Esta não deve ser considerada como uma actividade singular, mas sim como um

processo interactivo, iniciando-se com o desenvolvimento ou a optimização do método, e complementando-se com as exigências regulamentares.

Segundo as normas de regulamentação, o laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do seu âmbito de aplicação e extensões ou modificações de métodos normalizados (ICH, 1996).

Para satisfazer as necessidades de uma dada aplicação ou campo de aplicação, a validação deve ser tão exaustiva quanto necessário. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido.

Antes de se iniciar o processo de validação de um determinado método analítico deve-se ponderar sobre o âmbito de aplicação pretendido e quais os critérios de validação que são necessários demonstrar. Algumas das questões mais relevantes deste processo passam por reflectir sobre o analito que se pretende determinar, os níveis de concentração esperados, o tipo de matriz envolvida e se no final se pretende uma informação apenas qualitativa ou quantitativa, correspondendo à estimativa do seu teor (EDQM, 2005).

Devido a variedade de ensaios analíticos temos diferentes métodos que necessitam de diferentes programas de validação. A tabela 1.8 descreve os parâmetros a determinar, consoante o âmbito de análise a realizar (Guidance, 2000).

A validação de um método analítico garante e confere confiança ao processo de quantificação do analito numa determinada matriz a um certo nível de concentração. De acordo com a USP (*United States Pharmacopeia*) (CDER, 1994) os parâmetros analíticos usados para a validação de um método analítico são:

- 1.3.1 Selectividade
- 1.3.2 Gama de trabalho
- 1.3.3 Linearidade
- 1.3.4 Limites analíticos (limite de detecção e limite de quantificação)
- 1.3.5 Exactidão
- 1.3.6 Precisão
- 1.3.7 Estabilidade de soluções
- 1.3.8 Adequabilidade do sistema
- 1.3.9 Robustez

TABELA 1.8 - Exigências de validação dos métodos analíticos de acordo com a ICH. (Guidance, 2000)

Parâmetro de desempenho	Identificação	Pesquisa de impurezas		Doseamento Dissolução	Testes específicos
		Quantitativo	Limites		
Exatidão	-	+	-	+	+
Precisão-Repetibilidade	-	+	-	+	+
Precisão-Precisão Intermédia	-	+ ¹	-	+ ¹	+
Selectividade	+ ²	+	+	+	+
Limite de detecção	-	-	+	-	-
Limite de quantificação	-	+	-	-	-
Linearidade	-	+	-	+	-
Gama de trabalho	-	+	-	+	-
Robustez	-	+	-	+	+

(-) Característica normalmente não avaliada; (+) Característica normalmente avaliada; (1) Nos casos em que a reprodutibilidade foi avaliada, não é necessário determinar a precisão intermédia; (2) A ausência de Selectividade de um método analítico pode ser compensada por outro método analítico de suporte.

Quando ocorrem alterações no processo/fabrico (por exemplo, quando ocorrem alterações regulamentares e legislativas), as mudanças podem conduzir à necessidade de revalidação do procedimento analítico, sendo que, o grau da revalidação vai depender da natureza da mudança. Esta revalidação deve ser desenvolvida para garantir que o procedimento analítico mantém as suas características e para demonstrar que continua a assegurar a identidade, qualidade, actividade da substância activa e do fármaco, bem como a biodisponibilidade (ICH, Q2(R1), 2005).

1.3.1 Selectividade

A selectividade corresponde à capacidade de um método analítico determinar inequivocamente um analito na presença de outros componentes esperados na matriz, no caso de uma forma farmacêutica podem ser impurezas, produtos de degradação e/ou excipientes. Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias eventualmente presentes na matriz da amostra a analisar.

Em HPLC estes parâmetros são avaliados geralmente através da capacidade de resolução cromatográfica, da eficiência da separação e do factor de assimetria (CDER, 1994).

1.3.2 Gama de trabalho

A gama de trabalho de um método analítico corresponde ao intervalo entre a concentração mais baixa e a concentração mais elevada determinadas experimentalmente com precisão, exactidão e linearidade. Normalmente, pretende-se que na gama de concentrações o sinal instrumental forneça uma resposta linear como também homogeneidade da variância na variável dependente. Estas concentrações são evidenciadas estatisticamente através da calibração analítica do método. A Tabela 1.9 apresenta para cada determinação a respectiva gama de concentrações a validar.

TABELA 1.9 - Gama de trabalho

Determinação	Gama
Doseamento	50% – 150% de CT
Compostos relacionados	RT– 150% de E

CT: Concentração de trabalho; RT: *ReportingThreshold*; E: Especificação para o composto relacionado

1.3.3 Linearidade

A linearidade de um método analítico revela a habilidade do método produzir resultados directamente proporcionais à concentração do analito numa dada faixa de aplicação. Ou seja, verificar se existe uma relação linear entre os valores medidos e as concentrações dos padrões de calibração. Em termos gráficos, a linearidade do método pode ser comprovada através do coeficiente de correlação (r^2) da equação da recta de calibração obtida, que reflecte o grau de relação ou ligação entre as variáveis x (concentração) e y (resposta).

A ICH define um mínimo de cinco padrões para estabelecer a gama de linearidade da substância a quantificar (ICH, Q2(R1), 2005).

TABELA 1.10 - Soluções a preparar para avaliação da linearidade

Determinação	Soluções de referência
Doseamento	Activo ou outro constituinte: 50%, 75%, 100%, 125%, 150% de CT
Compostos relacionados: - Desconhecidos - Conhecidos	Activo: RT a 150% de E Composto relacionado: RT a 150% de E

CT: Concentração de trabalho; RT: *Reporting Threshold*; E: Especificação para o composto relacionado

1.3.4 Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de analito que é possível detectar com uma certa confiança estatística, mas não necessariamente quantificar. Esta concentração é útil para especificar a presença/ausência do analito na amostra. Em termos qualitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco. A quantificação deste valor de concentração está sujeita a erros significativos.

O limite de detecção (LOD) pode ser determinado através de 2 modos:

- a) Estimado através dos parâmetros da recta de regressão linear na gama de trabalho, utilizando a expressão:

$$\text{LOD} = \frac{3,3\sigma}{s}$$

Equação 1.1

σ - desvio padrão residual da recta de regressão

s - declive

- a) Estimado pelo método da razão sinal/ruído (S/R) através da equação (válido para métodos cromatográficos):

$$S/R = \frac{2H}{h}$$

Equação 1.2

H – altura máxima do pico do analito

h – amplitude do ruído (máximo – mínimo)

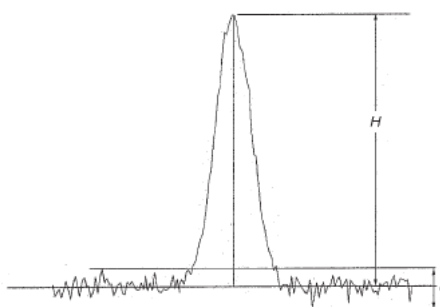


FIGURA 1.6 - Método da razão sinal/ruído (S/R) (Farmacopeia Europeia)

Considera-se aceitável para estimativa deste parâmetro uma solução de analito para a qual a razão S/R seja aproximadamente igual a 3.

1.3.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor concentração de analito que é possível quantificar com precisão e exactidão definidas e nas condições de operação especificadas.

O limite de quantificação (LOQ) pode ser determinado através de 2 modos:

- a) Estimado através dos parâmetros da recta de regressão linear na gama de trabalho, utilizando a expressão:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{s}$$

Equação 1.3

σ - desvio padrão residual da recta de regressão

s - declive

- a) Estimado pelo método da razão sinal/ruído (S/R) através da equação (válido para métodos cromatográficos):

$$S/R = \frac{2H}{h}$$

Equação 1.4

H – altura máxima do pico do analito

h – amplitude do ruído (máximo – mínimo)

Considera-se aceitável para estimativa deste parâmetro, uma solução de analito para a qual a razão S/R seja aproximadamente igual a 10.

O limite de quantificação estimado será subsequentemente validado através da análise de um replicado (frequentemente feito em placebo) sobrecarregado com o analito à concentração correspondente ao LOQ. Devem ser efectuadas seis medições sucessivas desta solução e avaliada a variabilidade dos resultados obtidos, expressa pelo coeficiente de variação.

1.3.6 Exactidão

A exactidão de um método analítico expressa a concordância entre os valores convencionalmente verdadeiros (concentração preparada ou nominal) e os valores encontrados pelo método (concentração calculada), podendo ser reportada em percentagem de recuperação (R%):

$$R\% = \frac{\text{Concentração calculada}}{\text{Concentração nominal}} \times 100$$

Equação 1.5

A exactidão do método é avaliada com recurso a um mínimo de nove determinações a três níveis de concentração do analito, as quais deverão cobrir a gama de trabalho, três replicados por cada nível de concentração. Para cada nível de concentração serão reportados a % recuperação individual e a % recuperação média.

TABELA 1.11 - Soluções a preparar para avaliação da exactidão

Determinação	Soluções de referência
Doseamento	A exactidão deve ser determinada pelo doseamento de amostras preparadas a 50%, 100% e 150% da concentração de trabalho.
Compostos Relacionados	A exactidão deve ser determinada pelo doseamento de amostras preparadas à concentração de trabalho e sobrecarregadas com quantidades conhecidas do composto relacionado, correspondentes ao <i>reporting threshold</i> , nível intermédio (habitualmente à concentração de especificação) e 150% da especificação para o composto relacionado

1.3.7 Precisão

A precisão do método analítico expressa o grau de concordância dos resultados entre ensaios independentes sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Pode ser determinada recorrendo a estimativas paramétricas como:

- a) Desvio padrão dos resultados (s), determinado pela equação 1.6:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}{n}}$$

Equação 1.6

Desvio padrão (s) da variável X com uma amostra de N elementos

b) Coeficiente de variação (%CV), estimado pela equação 1.7:

$$CV(\%) = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$

Equação 1.7

Onde s é o desvio padrão das recuperações e \bar{x} é a média.

A ICH recomenda a determinação a três níveis de precisão: repetibilidade (de sistema e de análise), precisão intermédia e reprodutibilidade.

1.3.7.1 Repetibilidade do sistema

A repetibilidade do sistema expressa a precisão do(s) equipamento(s) de análise nas mesmas condições de análise e num curto intervalo de tempo, ou seja, a precisão da resposta de análises múltiplas da mesma solução amostra ou solução padrão. A repetibilidade do sistema será determinada por análise múltipla (pelo menos 6) de uma solução padrão do analíto preparada a 100% da concentração de trabalho.

1.3.7.2 Repetibilidade de análise

A repetibilidade de análise corresponde à precisão obtida para ensaios efectuados sobre a mesma amostra num curto intervalo de tempo e em condições tão homogêneas quanto possível (mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e mesmo tipo de reagentes). Este ensaio deve ser efectuado com um mínimo de 6 determinações ao nível 100% da gama de trabalho.

TABELA 1.12 - Soluções a preparar para avaliação da repetibilidade de análise

Determinação	Soluções de referência
Doseamento	i) Doseamento de 6 replicados de amostra, preparados a 100% da concentração de trabalho. ii) Inferida a partir dos dados da exactidão
Compostos Relacionados	i) Doseamento de 6 replicados de amostra, preparados à concentração de trabalho e sobrecarregados com quantidades conhecidas do composto relacionado, correspondentes à especificação para o mesmo. ii) Inferida a partir dos dados da exactidão

1.3.7.3 Precisão intermédia

A precisão intermédia corresponde à precisão obtida nos ensaios sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exactamente as condições que variam. O procedimento utilizado é o descrito na repetibilidade da análise (ponto 1.3.7.2). Este tipo de estudo tem por objectivo avaliar a interferência que, a mudança de determinadas condições intralaboratoriais, podem ter no resultado final (análises em dias diferentes, com diferentes operadores, etc).

Deve ser avaliada a diferença (D%) entre os dois ensaios, bem como o desvio padrão combinado relativo dos mesmos, calculados pelas expressões:

$$D(\%) = | \text{Média do ensaio 1} - \text{Média do ensaio 2} |$$

Equação 1.8

$$\text{Desvio padrão combinado relativo (\%)} = \left(\frac{s}{\text{média dos dois ensaios}} \right) \times 100$$

Equação 1.9

em que s é o desvio padrão combinado dos dois ensaios, calculado pela expressão:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Equação 1.10

n_x – nº de determinações do ensaio x

s_x^2 – variância dos dados do ensaio x

1.3.7.4 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade expressa as variações entre laboratórios e tem como objectivo verificar que o método providência os mesmos resultados quando executado em diferentes laboratórios. A inclusão deste parâmetro na validação de um procedimento analítico é importante quando este vai ser usado em laboratórios diferentes (ex: estudos interlaboratoriais, transferências de métodos). Os laboratórios envolvidos devem analisar independentemente a mesma amostra seis vezes, seguindo o procedimento descrito na repetibilidade da análise (ponto 1.3.7.2).

1.3.8 Estabilidade das soluções

Para se obterem resultados reprodutíveis e confiáveis durante o processo de validação a estabilidade das soluções amostras e padrões deve ser determinada. Muitas vezes é

essencial que as soluções sejam estáveis, para que desta forma, se ocorrer algum atraso durante o processo, isso não vá influenciar os resultados obtidos. A estabilidade das soluções será avaliada através da seguinte expressão:

$$\text{Variação de concentração (\%)} = \frac{|C_f - C_i|}{C_i} \times 100$$

Equação 1.11

Cf/i – Concentração final / inicial

Deve ser determinada a estabilidade de soluções amostra e padrão preparadas à concentração de trabalho durante um período de tempo/período a definir, por comparação com uma solução padrão independente preparada no momento de análise (para períodos inferiores a 24h a estabilidade será avaliada relativamente ao padrão inicial). Neste trabalho em particular, foi definido um período de tempo até 3 dias.

1.3.9 Adequabilidade do sistema (*System Suitability*)

Os testes de adequabilidade do sistema são uma parte de vários procedimentos analíticos e pretendem garantir que o sistema implementado é adequado para o tipo de análise que se pretende realizar e pode ser mantido em funcionamento sem perda das características analíticas. Estes testes são baseados no conceito de que o equipamento, operações analíticas e amostras a serem analisadas constituem um sistema integral que pode ser avaliado como tal.

No caso da cromatografia, os testes de adequabilidade são utilizados para verificar que a resolução e reprodutibilidade do sistema cromatográfico são os adequados para a análise do analito e devem incluir a determinação da eficiência da coluna, a resolução entre os picos, o factor de simetria dos picos e a precisão de injeções múltiplas. Normalmente, estes testes são efectuados a partir de dados de injeções replicadas da solução de referência. Deve ser referido o método de cálculo dos parâmetros de adequabilidade do sistema (ex: USP, EP).

TABELA 1.13 -Testes de adequabilidade do sistema

Parâmetros (a)	Valores recomendados
Nº pratos teóricos (Eficiência) (N)	≥ 2000 (b)
Factor de simetria (FS)	0,8 – 1,5 (b)
Resolução entre picos adjacentes	≥ 1,5 (b)
Repetibilidade de injeção, CV (%), n≥6	≤ 2,0

(a) Calculados com dados relativos ao pico do analito

(b) Recomendações da Farmacopeia Europeia e CDER (FDA), *Validation of Chromatographic Methods*

1.3.10 Robustez

A robustez de um procedimento analítico é a capacidade deste em permanecer inalterado mediante a introdução deliberada de pequenas alterações nos parâmetros do mesmo, dando indicação sobre a sua fiabilidade durante a sua utilização normal. A robustez de um método deve ser avaliada durante a fase de desenvolvimento do mesmo e depende do procedimento em estudo.

Quando a resposta analítica do método é susceptível a variações mediante pequenas alterações nas condições analíticas do método, estas devem ser adequadamente controladas ou o procedimento analítico deverá incluir uma chamada de atenção para o facto. Uma consequência da avaliação da robustez deve ser o estabelecimento dos parâmetros de adequabilidade do sistema (ex.: teste de resolução) de forma a assegurar que a validade do método analítico se mantém sempre que é utilizado.

Como exemplo de variações induzidas às condições analíticas podemos ter de acordo com a EP (Farmacopeia Europeia):

- composição da fase móvel (componente minoritário $\pm 2\%$, em termos absolutos)
- pH do componente aquoso da fase móvel ($\pm 0,2$)
- concentração de sais no tampão da fase móvel ($\pm 10\%$)
- diferentes lotes de colunas
- temperatura da coluna ($\pm 10^{\circ}\text{C}$)
- caudal ($\pm 50\%$)

1.3.11 Critérios de aceitação para validação analítica do método de limpeza

A validação de limpeza, por ser um requerimento das autoridades regulamentares, estabelece os parâmetros, critérios e metodologias a fim de demonstrar que o procedimento de limpeza produz resultados que estão de acordo com as especificações exigidas. Na Tabela 1.14 encontram-se descritos os critérios de aceitação que servirão de base para este trabalho.

TABELA 1.14 - Critérios de aceitação a para validação analítica do método de limpeza

PARÂMETRO DE VALIDAÇÃO	CONDIÇÕES /CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO														
Gama de trabalho	- LOQ a 150%														
Selectividade	Picos interferentes: - Quaisquer outros picos deverão estar bem separados do pico do analito (factor de resolução (RF) ≥ 1,5)														
Linearidade	- Coeficiente de correlação (r ²) ≥ 0,99; - Desvio (D) máximo e mínimos incluídos no intervalo 90 – 110 %; - CV dos desvios (D) ≤ 10%														
Limite de quantificação	- CV da resposta analítica da solução LOQ ≤ 10%														
Exactidão	<table><tr><th>Nível</th><th>Recuperação</th><th>Critério de aceitação</th></tr><tr><td>Limite inferior</td><td>≥ 60%</td><td>CV ≤15,0%</td></tr><tr><td>Intermédio</td><td>≥ 70%</td><td>CV ≤10,0%</td></tr><tr><td>Limite superior</td><td>≥ 70%</td><td>CV ≤10,0%</td></tr></table>			Nível	Recuperação	Critério de aceitação	Limite inferior	≥ 60%	CV ≤15,0%	Intermédio	≥ 70%	CV ≤10,0%	Limite superior	≥ 70%	CV ≤10,0%
	Nível	Recuperação	Critério de aceitação												
	Limite inferior	≥ 60%	CV ≤15,0%												
	Intermédio	≥ 70%	CV ≤10,0%												
Limite superior	≥ 70%	CV ≤10,0%													
Precisão	- <u>Repetibilidade do sistema</u> - CV das respostas analítica ≤ 5%														
	- <u>Repetibilidade da análise</u> – CV dos resultados obtidos, expressos em % recuperação ≤ 10,0%														
	- <u>Precisão Intermédia</u> – Diferença: ≤ 20,0%														
	– CV combinado: ≤ 15,0%														
Estabilidade	<table><tr><th>Parâmetro</th><th>Critério de aceitação</th></tr><tr><td>Estabilidade em placas</td><td>Recuperação ≥ 70%</td></tr><tr><td>Estabilidade de soluções</td><td>Variação ≤ 20%</td></tr></table>			Parâmetro	Critério de aceitação	Estabilidade em placas	Recuperação ≥ 70%	Estabilidade de soluções	Variação ≤ 20%						
	Parâmetro	Critério de aceitação													
	Estabilidade em placas	Recuperação ≥ 70%													
Estabilidade de soluções	Variação ≤ 20%														

1.4 LIMPEZA NA INDUSTRIA FARMACÊUTICA

Na actualidade do mundo da indústria farmacêutica a importância da limpeza industrial é cada vez maior pela necessidade de garantir ao cliente e doente, qualidade nos produtos e serviços. Quando tratamos de validação de limpeza, a principal consideração é a segurança do doente, pois este é o principal tratamento para limitar de forma significativa a contaminação cruzada e eliminar todos os resíduos. A validação de limpeza de equipamentos numa indústria farmacêutica, é requisito imprescindível dentro das boas práticas de fabrico de medicamentos.

O objectivo da validação de limpeza é provar que o equipamento está limpo, com resíduos de produto e agente de limpeza em níveis aceitáveis para prevenir uma possível contaminação e contaminação cruzada (OMS, 2006).

Segundo as normativas (FDA, 1993) o conceito de limpeza é definido como uma operação que consiste em extrair de uma dada superfície, todos os resíduos visíveis ou invisíveis que esta possa conter. Por outro lado, validação define-se como um acto documentado que demonstre que os procedimentos de limpeza removem resíduos a níveis pré-determinados de aceitação, tendo em consideração factores como o tamanho do lote, dosagem, dados toxicológicos, solubilidade e área de contacto do equipamento com o produto.

Antes do início da validação de limpeza algumas considerações devem ser verificadas:

- Existência de procedimentos de limpeza padronizados;
- Se os procedimentos estão adequados para determinada limpeza específica;
- Se as seguintes informações estão padronizadas: agente de limpeza, concentração e volume do agente de limpeza, temperatura da solução de limpeza, tempo de contacto, tipo de água de enxaguamento e tempo de enxaguamento.
- Formação dos operadores que realizarão a limpeza;

Além destas informações, segundo Guias relacionados à Garantia de Qualidade, deve-se definir por quanto tempo o equipamento pode permanecer sujo, antes que a limpeza seja executada, pois a efectividade de um procedimento de limpeza é inversamente proporcional ao tempo que o mesmo permanece sujo. Segundo a OMS (2006) o período e condições de armazenagem do equipamento antes de sua limpeza e o tempo entre limpeza e reuso do equipamento devem fazer parte da validação do procedimento de limpeza.

Uma das características principais da validação de limpeza é que ela envolve tanto o produto finalizado quanto o próximo produto a ser fabricado no equipamento já limpo. Trata-se de um processo complexo, moroso, que envolve investimentos e resultados a longo prazo. Numa indústria farmacêutica onde são fabricados n produtos, é natural que se pretenda validar a limpeza de todos os processos. Porém a dificuldade aumenta à medida que n cresce, uma vez que, crescem as possibilidades de novas sequências de fabricação e com elas inúmeras situações distintas ao se considerar o produto fabricado e o produto subsequente.

Uma alternativa para a validação de limpeza de n processos de produção de medicamentos, são as estratégias de agrupamento. O objectivo do agrupamento consiste em validar um procedimento de limpeza que seja representativo de um grupo de processos de

limpeza e portanto assumir que estes também se encontram validados, reduzindo assim o volume de trabalho. Existem dois métodos de agrupamento em validação de limpeza, nomeadamente por produto e o agrupamento por equipamento, contudo o caso mais difícil (*worst case*), deve ser o escolhido para representar a limpeza de todos os equipamentos da unidade. Trata-se de uma simplificação da validação dos processos de limpeza, actualmente aceite dentro dos requisitos de GMP (LE BLANC, 2000).

A validação do procedimento de limpeza estende-se somente às áreas que entram directamente em contacto com o produto ou activo farmacêutico (superfície interna de reactores, tanques, equipamentos de embalagem primária e utensílios de pesagem) ou superfícies que eventualmente possam ter contacto com o produto (ventiladores de estufas, elementos de aquecimento, etc). O procedimento de limpeza das áreas onde o produto ou activo farmacêutico não entra em contacto directo não faz parte do estudo de validação de limpeza. A validação de limpeza deve ser considerada importante em equipamentos multiuso.

A limpeza necessária para equipamentos multiuso é muito mais complexa que para equipamentos dedicados. Isto deve-se ao facto da validação de limpeza não focar somente a limpeza e remoção do produto, mas também definir o critério de aceitação baseado na possível contaminação do próximo produto fabricado no mesmo equipamento. Procedimentos de limpeza adequados sempre dependem do próximo produto que é fabricado no mesmo equipamento, assim se um novo produto for introduzido num equipamento com sua validação de limpeza já concluída, o impacto do novo produto sobre a validação deve ser avaliado, e particularmente o limite de aceitação do resíduo de produto (LE BLANC, 2000).

De acordo com o ICH Q7 se vários ingredientes farmacêuticos activos ou intermediários são produzidos no mesmo equipamento e este equipamento é limpo pelo mesmo procedimento, um destes pode ser seleccionado para validação de limpeza. Esta selecção de “pior caso” deve ser baseada na solubilidade e dificuldade de limpeza. Este mesmo pensamento também é mostrado pela OMS onde segundo esta organização os procedimentos de limpeza para produtos e processos que são similares não precisam ser validados individualmente. O estudo de validação do “pior caso” é considerável aceitável. O produto representante escolhido como “pior caso” deve ser aquele com maior dificuldade de limpeza.

Várias metodologias de validação de limpeza de equipamentos têm sido testadas (Mazonakis *et al.*, 2002; Westman&Karisson, 2000; Mirza *et al.*, 1999; Segretario *et al.*, 1998; Hwang, R-C. *et al.*, 1998; Shea *et al.*, 1996; Fourman *et al.*, 1993; Alencar *et al.*, 2005), porém cada indústria tem desenvolvido os seus próprios critérios e metodologias (Agalloco, 1992). Muitos critérios são utilizados para a escolha do “pior caso”, como o produto menos solúvel, ou o mais tóxico, ou o mais difícil de limpar, ou a inclusão de novos produtos, etc. Poucos trabalhos abordam a sistemática de se escolher um produto para representar o “pior caso” numa validação de limpeza. Nos poucos estudos disponíveis que abordam este assunto, LeBlanc (2000) aborda o tema de forma sistemática e discute as vantagens e desvantagens de se eleger produtos para representar um grupo de outros.

1.4.1 Definição do “pior caso” (*Worst Case*)

O número de combinações possíveis entre produtos contaminantes e subsequentes pode assumir proporções tão grandes que inviabilizariam a execução de um estudo abrangendo todas as possibilidades, portanto, a escolha do “pior caso” para o qual um determinado procedimento deve ser exposto é vital para que o processo de validação se torne praticável

O “pior caso”, é uma situação, por vezes hipotética, onde se estabelece a pior situação que poderia acontecer numa linha de produção no que se refere à criticidade da limpeza. O “pior caso” é formado pelo contaminante (produto manipulado previamente na respectiva linha de produção e que poderia vir a contaminar o subsequente) e subsequente (produto que ao ser contaminado levaria ao paciente a maior dose do contaminante em questão).

O melhor candidato a contaminante é aquele que apresenta a melhor combinação das seguintes propriedades:

- Menor solubilidade no solvente utilizado no procedimento de limpeza
- Mais difícil de ser removido segundo a experiência dos operadores
- Maior toxicidade
- Menor dose terapêutica

A principal característica a ser observada no contaminante é a solubilidade: a escolha do menos solúvel basta como critério. Os outros critérios também podem ser avaliados, mas dentro de um sistema de pontuação, a solubilidade tem a ponderação maior entre todos os outros critérios.

O candidato a melhor produto subsequente é aquele que apresentar o menor valor para a razão entre o menor tamanho de lote e a maior dose terapêutica.

A empresa também pode adoptar a escolha de um “pior caso” imaginário, não levando em conta um subsequente real e sim um imaginário que agregue as piores qualidades possíveis, ou seja, tal subsequente imaginário terá o menor tamanho de lote e a maior dose terapêutica, facto que nem sempre está associado num mesmo produto. Tal critério, embora pareça demasiadamente cuidadoso, serve para construir um estudo de validação de limpeza robusto, que no futuro suporte a inclusão de novos produtos ou tamanhos de lote no plano de fabricação, sem que resulte a necessidade da realização de nova validação.

A escolha da dexametasona para este estudo, constitui o produto eleito como “pior caso” para validação de limpeza na unidade piloto de formas farmacêuticas sólidas do LEF, pois de entre os vários produtos fabricados na mesma unidade, a dexametasona reúne propriedades de baixa solubilidade, alta toxicidade e dificuldade de limpeza dos equipamentos reconhecida pelos operadores.

A escolha de um “pior caso” visa reduzir os trabalhos de validação, onde após escolha do pior ou dos piores casos que possam dar suporte ao trabalho de validação de limpeza, se pode extrapolar para outros produtos.

O laboratório farmacêutico envolvido no presente estudo (LEF), possui no seu plano de produção vários produtos. Na Tabela 1.18 encontram-se os três principais produtos fabricados nos equipamentos em questão, e todos os dados necessários para a determinação da substância activa a seleccionar como “pior caso”. A substância activa a ser escolhida para efectuar a validação de limpeza, será aquela que totalizar a maior pontuação, considerando os seguintes critérios:

- Solubilidade em água
- Actividade
- Toxicidade (LD_{50})

TABELA 1.15 - Categorias referentes ao critério de solubilidade em água

Pontuação	Categoria	Solubilidade
0	Solúvel	Muito solúvel
		Facilmente solúvel
1	Pouco solúvel	Ligeiramente solúvel
		Pouco solúvel
2	Insolúvel	Muito pouco solúvel
		Praticamente insolúvel ou insolúvel

TABELA 1.16 - Categorias referentes ao critério de actividade

Pontuação	Categoria	Intervalo da menor dose terapêutica
0	Não activo	>1000mg
		100 – 1000mg
1	Actividade média	10 – 99mg
2	Actividade elevada	1 – 9mg
		>1mg

TABELA 1.17 - Categorias referentes ao critério de toxicidade

Pontuação	Categoria	LD ₅₀
0	Atóxico	> 5000mg/kg
1	Tóxico	50 – 5000mg/kg
2	Muito tóxico	>50mg/kg

TABELA 1.18 - Resumo de principais ingredientes activos utilizados em produção no LEF

Produto	Forma Farmacêutica	Toxicidade LD ₅₀ (mg/kg)	Solubilidade	Actividade
Dexametasona	Comprimidos	Tóxico (3000)	Insolúvel em água	Actividade elevada
Ambroxol	Comprimidos	Tóxico (2720)	Ligeiramente solúvel em água	Não activo
Ácido Acetilsalicílico	Comprimidos	Tóxico (400)	Pouco solúvel em água	Não activo

A partir da tabela anterior, conclui-se facilmente que a substância activa que apresenta melhores características para ser a escolhida, será a dexametasona, uma vez que apresenta toxicidade elevada, insolubilidade total em água, e ainda por ser reconhecida como um produto de difícil limpeza, segundo a experiência dos operadores da área.

É de extrema importância sublinhar a importância de uma adequada formação dos operadores aquando da limpeza dos referidos equipamentos, pois ao contrário de muitos outros requisitos GMP, a validação por si só, não melhora os processos. Ela apenas pode confirmar ou não, dependendo do caso, que o processo foi adequadamente desenvolvido e que se encontra sob controlo. É igualmente importante estabelecer que não existe um único caminho para executar um processo de validação de limpeza e que o ponto comum a ser encontrado é a existência de critérios, parâmetros e metodologias que sejam cientificamente justificáveis, demonstrando claramente que o procedimento de limpeza produz resultados que estão de acordo com as especificações pré-estabelecidas.

O primeiro passo num estudo de validação de limpeza é proceder à avaliação do próprio procedimento de limpeza. Não é incomum que as empresas percam muito tempo a elaborar metodologias de detecção de resíduos e complexos planos de amostragem sem antes rever o procedimento de limpeza para assegurar que o mesmo é lógico e deve, portanto, ser eficaz.

Para a execução de um estudo de validação de limpeza, devem ser tidos em conta cinco elementos principais, sendo eles:

- Procedimentos de limpeza
- Procedimentos para determinar a limpeza - Amostragem (por exemplo: *swab*)
- Testes de quantificação para resíduos de activos e de agentes de limpeza
- Limites de resíduos químicos e microbiológicos
- Protocolos e relatórios para validação de limpeza.

1.4.2 Delineamento do Procedimento de Limpeza

No delineamento de qualquer procedimento de limpeza há que considerar aspectos de natureza química, como o mecanismo de limpeza, a escolha do(s) agente(s) de limpeza e aspectos de engenharia que incluem o método de limpeza e o estabelecimento dos parâmetros que influenciam o processo, como o tempo, a temperatura, a agitação, a concentração do detergente, entre outros (LE BLANC, 2000).

a) Factores relacionados com o equipamento

Idealmente, deve existir um procedimento de limpeza de um equipamento, tendo em conta os produtos que estão a ser fabricados, ou seja, se a limpeza será feita entre lotes do mesmo produto (como numa campanha prolongada), ou se a limpeza será feita entre lotes de diferentes produtos. O desenho do equipamento pode também influenciar na eficácia do processo de limpeza, pelo que esta, deve ser tida em conta na elaboração de um protocolo de validação de limpeza.

b) Factores relacionados com agentes de limpeza

As soluções de limpeza geralmente contêm agentes alcalinos ou ácidos, com ou sem detergentes, por exemplo, agentes tensioactivos não iónicos. Estas devem ser compatíveis com a superfície a limpar, ter boa capacidade de humificação e emulsificação e serem capazes de remover o tipo de sujidade presente sem deixar nenhum tipo de resíduo.

Os detergentes devem facilitar o processo de limpeza e devem ser facilmente removíveis. Deve evitar-se sempre que possível, que os detergentes tenham resíduos persistentes, tais como detergentes catiónicos que aderem fortemente ao vidro e são difíceis de remover.

Não é raro o uso de água como agente de limpeza, ou pelo menos como dissolvente na maioria dos processos de limpeza. A água tem muitas vantagens, tais como o seu baixo custo, não apresenta toxicidade para os trabalhadores e para o meio ambiente, e não apresenta resíduos após enxaguamento. Contudo, com a finalidade de otimizar e melhorar os processos de limpeza, adicionam-se à água aditivos como detergentes para facilitar a eliminação de sujidade. Estes detergentes agregam-se à água e são utilizados pelas suas propriedades e poderes de molhar (*Wetting*) (diminui a tensão superficial), emulsionante (emulsiona as gorduras), dispersão e sequestro (suspensão de sólidos).

O uso de detergentes na indústria farmacêutica é muito importante, contudo existem algumas desvantagens, como o aparecimento de novos produtos químicos, fonte de toxicidade, tanto para operadores como para o meio ambiente e principalmente a elevada contaminação por resíduos, o que implica que quando se validam os procedimentos de limpeza, também se deve ter em conta a possibilidade de decomposição dos detergentes.

As principais características de um bom detergente são:

- Manter a integridade da superfície
- Baixa toxicidade: um detergente deve ser o menos tóxico possível, assim como o mais ecológico possível
- Emulsão
- Redeposição
- Ser estável a altas temperaturas
- Fácil eliminação
- Detectável: um bom detergente deve ser doseado a baixas concentrações. Este parâmetro é necessário no caso de validação de limpeza. A eleição do detergente é crítica e determina o resultado do processo de limpeza. É importante determinar a natureza do resíduo para lhe adaptar um tipo de limpeza.

c) Factores relacionados aos métodos de limpeza

Ao estabelecer um programa de validação de limpeza, é importante inicialmente caracterizar os tipos de limpeza que são utilizados na instalação. Os métodos de limpeza que são utilizados numa instalação podem revelar factores importantes no que diz respeito ao controlo, reprodutibilidade, as melhores formas de recolha das amostras, acompanhar a eficácia da limpeza durante a rotina.

Os métodos de limpeza são normalmente diferenciados em função da necessidade de desmontar o equipamento para se proceder à sua limpeza e no contacto do agente com a superfície a limpar. Existe uma forte tendência para minimizar a intervenção humana no processo de limpeza, e para minimizar o contacto com produtos perigosos, assim como existe uma preocupação em superar a falta de reprodutibilidade de limpeza manual. Há três principais tipos de processos de limpeza que são utilizados na indústria farmacêutica, os quais apresentam vantagens e desvantagens.

- Limpeza Manual: A limpeza manual é tipicamente definida como a limpeza directa do equipamento por um operador treinado, utilizando ferramentas manuais e agentes de limpeza (esfregando ou escovando a superfície a limpar). A principal vantagem deste tipo de limpeza está relacionada com as áreas críticas dificilmente alcançáveis com outros tipos de limpeza. O principal inconveniente é a falta de reprodutibilidade do método.

- Limpeza Semi-Automática: Ao contrário da limpeza manual, a limpeza semi-automática inclui diferentes níveis de controlo automático. Pode consistir simplesmente na remoção manual de partes menores, para limpeza manual, antes de limpeza automática e utilizar um dispositivo de alta pressão para limpar uma superfície. Este processo de limpeza difere da limpeza manual porque requer um aparato mais sofisticado para auxílio do operador na execução do procedimento de limpeza.
- Limpeza Automática: A limpeza automática não envolve a intervenção de pessoas directamente no processo de limpeza. O sistema é programado para um ou vários ciclos de limpeza. Este tipo de sistema promove limpeza reproduzível devido à automação do processo. Assim como na limpeza manual, alguns parâmetros críticos estão envolvidos na limpeza automática, incluindo a quantidade de agentes de limpeza, o volume de água de enxaguamento, a temperatura de lavagem, o tempo gasto para se lavar e a quantidade de ciclos de limpeza, além da concentração de detergente utilizada.

Dentro da limpeza automática, destacam-se dois termos, CIP e COP.

CIP - O termo “*Clean in Place*” (limpeza no local) geralmente refere-se a um sistema totalmente automatizado, o qual depende pouco do operador, que consiste num sistema de recirculação, que utiliza vários tanques e um sistema de devolução, que utiliza bombas de retorno. Estes sistemas são normalmente utilizados para limpar grandes pedaços do equipamento, tais como reservatórios, misturadores e reactores.

COP - O termo “*Clean Out Place*” (limpeza fora do local) ocorre quando parte do equipamento é removido ou transportado para uma estação de limpeza separada, onde é fixada e o processo de limpeza é executado automaticamente.

TABELA 1.19 - Comparação de limpeza manual e automática (Le Blanc, 1998)

Parâmetros	Limpeza Manual	Limpeza Automática
Tempo	Baixo (independentemente do tipo de limpeza das superfícies)	Tempo de latência varia entre as diferentes etapas de lavagem
Força de acção Mecânica	Força relativamente alta Muito difícil de quantificar Não uniforme	Força relativamente baixa Difícil de quantificar Mais uniforme
Concentração	Baixa concentração Baixos níveis de detergente tóxicos	Concentração e composição química pouco agressiva Detergentes debilmente ácidos ou alcalinos
Temperatura	Geralmente baixas Variação por condições ambientais	Temperaturas altas Melhores controlos e regulações

d) Factores relacionados a parâmetros do processo

Os parâmetros do método ou do processo para a limpeza, são também factores de influência significativa na velocidade de limpeza, assim como na sua duração, pelo que devem ser considerados oito parâmetros durante a execução de um procedimento de limpeza (LE BLANC, 2000).

1) TEMPO

O tempo durante o qual se realiza o processo. As reacções químicas que conduzem à limpeza nunca são instantâneas. A quantidade de sujidade ou resíduos pela limpeza é uma função de tempo.

2) TEMPERATURA

O aumento da temperatura multiplica a acção do detergente, pois:

- diminui a tensão superficial da água
- acelera as reacções químicas
- facilita a saponificação das gorduras e a sua hidrolise
- produz agitação térmica por movimentos de convecção e ebulição, pelo que facilita a desinfecção.

Por outro lado, a temperatura está limitada por:

- o ponto de ebulição da água
- o custo de energia calorífica
- a resistência térmica de certos materiais
- a sujidade (coagulação de proteínas, caramelização de hidratos de carbono)
- método de aplicação.

3) ACÇÃO MECÂNICA

Esta acção pode aumentar e facilitar o contacto entre a sujidade e a solução do detergente. Esta acção mecânica pode ser causada por uma maior turbulência nas tubagens, agitação das partes de limpeza, a pressão (de acção manual, lavagem a pressão).

4) ACÇÃO FÍSICO-QUÍMICA (CONCENTRAÇÃO)

Todo o detergente tem uma concentração óptima para ser usada, determinada nos ensaios. Uma falsa crença seria que o detergente que está mais concentrado, é mais eficaz, porque na realidade acima de uma certa concentração, a lavagem é dificultada, e podem ser produzidos resíduos tóxicos tanto para os operadores como para o ambiente. Geralmente, os detergentes são utilizados numa concentração de 1 a 5% (v/v), mas que eventualmente podem atingir os 15%.

5) AGITAÇÃO

A agitação é fundamental para garantir a uniformidade da solução de lavagem ou de enxaguamento em todo o sistema a limpar, sendo que o que se pretende é remover o produto do equipamento e não uniformizar o agente de limpeza.

6) TIPO DE SUPERFÍCIE

É importante identificar o tipo de superfície a limpar, sendo os mais comuns o aço inox, o vidro e uma variedade de plásticos. Os esforços devem estar concentrados nas superfícies de maior dificuldade de limpeza.

7) ESTADO DO CONTAMINANTE

Habitualmente, o estado do contaminante depositado à superfície do equipamento a limpar pode ser classificado em: recentemente depositado, seco, cozido ou compactado. De acordo com o seu estado pode haver uma retardação na penetração da solução de limpeza nos produtos a remover, aumentando o tempo para uma limpeza eficiente.

8) ENXAGUAMENTO

É importante garantir que a solução de enxaguamento contacta de forma adequada com todas as superfícies, removendo de forma eficaz a solução de limpeza e os resíduos que esta contém.

A melhor maneira de desenvolver com sucesso um procedimento de limpeza passa por fazer algumas experiências à escala laboratorial, com o objectivo de seleccionar o agente de limpeza e algumas condições chave no processo (tempo, temperatura e concentração do agente) e só depois confirmar e otimizar o processo à escala piloto.

A validação do procedimento de limpeza estende-se somente às áreas onde o produto ou activo farmacêutico entra directamente em contacto (superfície interna de reactores, tanques, equipamentos de embalagem primária e utensílios de pesagem). O procedimento de limpeza das áreas onde o produto ou activo farmacêutico não entra em contacto directo não faz parte do estudo de validação de limpeza.

No mínimo três aplicações consecutivas do procedimento de limpeza devem ser executadas demonstrando sucesso para que o procedimento possa ser considerado validado. O critério de “testar até limpo” não é considerado aceitável. Tal conceito envolve limpeza, amostragem e teste, com a repetição dessa sequência até que um limite de resíduo aceitável é encontrado. Para um sistema ou equipamento com o processo de limpeza validado, essa prática de “testar até limpo” não deve ser utilizada. A prática de “testar até limpo” não deve substituir a necessidade de validação dos procedimentos de limpeza.

Os métodos analíticos devem ser desafiados em combinação com os métodos de amostragem usados para demonstrar que os contaminantes podem ser recuperados da superfície do equipamento e para demonstrar a que nível os mesmos são recuperados. Essa etapa é necessária antes da avaliação dos resultados provenientes das amostras, pois estes

devem ser corrigidos pelos factores de recuperação. Testes negativos podem ser resultantes de técnicas de amostragem incorrectas.

1.4.3 Métodos de amostragem em validação de limpeza

A amostragem em validação da limpeza tem como objectivo a recolha de amostras representativas das superfícies limpas do equipamento para avaliação da adequabilidade do processo de limpeza, ou seja, os métodos de amostragem utilizados devem ser capazes de medir quantitativamente os níveis de resíduos remanescentes na superfície do equipamento após a limpeza.

Os procedimentos de amostragem devem incluir, a descrição da metodologia usada para a recolha de resíduos depositados na superfície limpa do equipamento, de modo a que estes possam ser quantificados através de métodos analíticos devidamente validados.

Existem quatro tipos de métodos (directos e indirectos) de amostragem em validação de limpeza:

- Amostragem directa da superfície (envolve a aplicação de um instrumento analítico directamente na superfície limpa, sendo exemplo a avaliação visual ou a colocação de sondas na superfície do equipamento e a sua posterior análise por técnicas de infravermelho) ou por *swab* (é a mais amplamente usada, pelo que irá ser descrita em maior pormenor)
- Amostragem indirecta da superfície por enxaguamento (*rinse*) ou por amostragem do tipo placebo. Segundo a OMS, o ideal é a combinação do método de *swab* e enxaguamento.

a) Amostragem directa da superfície (*swab*)

O tipo de *swab* utilizado interfere potencialmente no teste, por isso devem ser utilizados *swabs* adequados em que o material da sua construção não interfira na análise, como exemplo não reaja com o solvente utilizado, não deve ainda ser fonte de contaminação adicional ou interferir na metodologia analítica.

O *swab* é um instrumento constituído por uma cabeça ligada a uma haste de plástico, tal como se ilustra na Figura 1.6. A cabeça do *swab* é constituída por um material fibroso e é usada para limpar a superfície que se pretende amostrar. Na amostragem de resíduos químicos a cabeça do *swab* é constituída por uma malha de poliéster.



FIGURA 1.7 - Exemplo de um *swab*

De acordo com a OMS (2006) a área que será amostrada por *swab*, o fornecedor do *swab*, o número de *swabs* utilizados, se o *swab* é utilizado seco ou húmido, a manipulação do *swab* e a técnica de amostragem são alguns factores que devem ser considerados nesta amostragem. Assim, deve ser elaborado um protocolo de amostragem onde são estabelecidos os seguintes itens:

1) *Humedecimento da cabeça do swab* – é seleccionado o solvente adsorvente do potencial contaminante da superfície do equipamento (água, solvente orgânico ou mistura) e a quantidade do mesmo a impregnar no *swab*. O solvente deve ser adequado à remoção do contaminante e compatível com a técnica analítica de quantificação que se pretenda usar;

2) *Zonas e áreas da superfície a amostrar* – São definidas as zonas de recolha (pontos críticos) e a área da superfície a amostrar;

3) *Modo de amostrar* – é definido o padrão de movimentos a efectuar com a cabeça do *swab* humedecido sobre a área a amostrar. O sentido e direcções são os que se apresentam no esquema sendo necessário estabelecer o número de passagens.

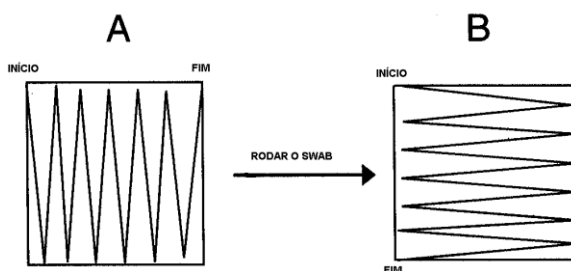


FIGURA 1.8 - Exemplo do movimento do *swab* (LEBLANC, 2000)

É ainda definido o número de *swabs* a usar. Geralmente, deve utilizar-se no primeiro contacto o *swab* humedecido como descrito e no último contacto (segundo *swab*) um *swab* seco. Todos os *swabs* são recolhidos no material de acondicionamento de amostragem.

4) *Acondicionamento do material de amostragem* - É seleccionado o solvente extractante do contaminante adsorvido na cabeça do *swab* (água, solvente orgânico ou mistura) e a quantidade do mesmo a introduzir no recipiente de recolha. O solvente deve ser adequado à remoção do contaminante e compatível com a técnica analítica de quantificação que se pretenda usar. O recipiente de recolha deve ser apropriado (normalmente frasco de vidro tipo III, âmbar, rolhado) e estar devidamente rotulado com identificação da limpeza em avaliação, da zona / área amostrada, solvente / volume, tipo de *swab*, data de recolha e operador. A cabeça do *swab* é destacada da haste e colocada em recipiente respectivo.

5) *Análise da solução resultante para avaliação dos níveis do contaminante.*

b) Amostragem indirecta da superfície (por enxaguamento)

A amostragem por enxaguamento envolve a recolha de um líquido que está em contacto com a superfície a amostrar e que escorre sob a mesma. O método mais comum de executar a amostragem por enxaguamento consiste em fazer a recolha da amostra à saída do circuito de limpeza, ou seja, é feita a recolha do último líquido de enxaguamento usado na lavagem. O volume de recolha é condicionado por requisito do método analítico e deve ser definido.

O recipiente de recolha deve ser apropriado (normalmente frasco de vidro tipo III, âmbar, rolhado) e estar devidamente rotulado com identificação da limpeza em avaliação, da zona / área amostrada, solvente / volume, data de recolha e operador.

c) Amostragem do tipo placebo

A amostragem do tipo placebo envolve o fabrico no equipamento limpo de um lote placebo do produto subsequente, após o que as amostras do produto placebo são analisadas para pesquisa do contaminante alvo, como por exemplo o activo do produto anteriormente fabricado naquele equipamento.

Abaixo, na Tabela 1.20, listamos os dois métodos de amostragem mais comuns, com as suas vantagens e desvantagens. O método de extracção por placebo ou produto também é referido, no entanto, este é pouco recomendável. Como já foi referido, deve ser seleccionado o tipo de amostragem mais conveniente atendendo às características de engenharia do equipamento.

TABELA 1.20 - Vantagens e desvantagens de métodos de amostragem

Método	Vantagens	Desvantagens
Amostragem directa da superfície (swab)	<p>Resíduos secos e insolúveis podem ser retirados.</p> <p>Permite o estabelecimento do nível de contaminação por área, estabelecendo onde o procedimento necessita de ser melhorado e se realmente os pontos críticos correspondem às expectativas.</p> <p>Permite a recuperação do contaminante a partir de áreas onde a água de enxaguamento teve contacto deficiente.</p>	<p>A área a ser amostrada deve permitir livre acesso ao operador, o que é impraticável em muitos equipamentos.</p> <p>O solvente e o material do <i>swab</i> não devem ser fonte de contaminação adicional ou interferir na metodologia analítica.</p> <p>A percentagem de recuperação do activo por parte do <i>swab</i>, deve ser estabelecida utilizando um estudo de recuperação que mimetize exactamente o procedimento utilizado na prática (mesmo <i>swab</i>, placa com o mesmo tipo de material constituinte do equipamento, definição da área).</p> <p>Possível interferência do material de construção do <i>swab</i>, deve ser avaliada durante o estudo de validação da metodologia analítica.</p>
Amostragem indirecta da superfície (amostras de enxaguamento)	<p>Permite a amostragem de grandes áreas.</p> <p>Permite a amostragem de áreas de difícil acesso como bicos de envase, tubulações e pequenas peças.</p>	<p>Causa a diluição do contaminante, o que por vezes compromete ou impossibilita o desempenho da metodologia analítica.</p> <p>O contaminante pode não ser solúvel no solvente utilizado.</p> <p>O contaminante pode estar aderido em alguma superfície, de modo que um simples enxaguamento não seja capaz de retirá-lo.</p> <p>A metodologia analítica utilizada deve ser específica para o contaminante, métodos não específicos como a adopção do critério da farmacopeia para a água utilizada em enxaguamentos não são aceitáveis. Em alguns casos como por exemplo bicos de envase, as primeiras porções extraídas serão sempre as mais contaminadas. Portanto, deve ser feita a uniformização para todo o conteúdo.</p>
Extrapolção por placebo ou produto	<p>Não existem vantagens, tal metodologia não é recomendável.</p>	<p>Dilui muito o contaminante e aumenta consideravelmente o número de possíveis interferências, dificultando o trabalho da metodologia analítica utilizada.</p> <p>A contaminação do placebo ou do produto não é uniforme, podendo estar concentrada em pontos que passaram primeiro por lugares de maior concentração.</p>

Estudos de recuperação devem ser realizados para a amostragem adoptada. Deve haver evidências de que as amostras são recuperadas com precisão. Segundo a OMS, uma

recuperação maior que 80% é considerada boa, entre 50% e 80% razoável e menor que 50% questionável. Já para o LEF são desejáveis factores de recuperação acima de 70,0%.

Os métodos analíticos utilizados devem ser desafiados em combinação com os métodos de amostragem utilizados, para demonstrar que os contaminantes podem ser recuperados a partir da superfície do equipamento com certa consistência. Isso é necessário antes que qualquer conclusão seja feita a respeito dos resultados encontrados. Resultados negativos podem ser uma consequência de uma inadequada metodologia de amostragem.

1.4.4 Determinação dos Critérios de Aceitação

Um aspecto essencial na Validação de Limpeza é determinar “quão limpo é suficientemente limpo”. A escolha do critério deve ser cientificamente comprovada, não podendo ser arbitrária, evitando assim questionários das autoridades reguladoras.

Podemos desde já identificar três limites analíticos diferentes, apesar destes se relacionarem uns com os outros: limite de aceitação para a contaminação no produto seguinte (ppm ou µg/g), limite de aceitação para a contaminação da superfície (µg/cm²) e limite de aceitação para a contaminação da solução analisada.

Apesar de oficialmente não mencionar critérios adoptados por indústrias farmacêuticas, a FDA dos Estados Unidos da América faz referência a critérios adoptados pela empresa Eli Lilly, que estabelece os seguintes critérios (Leblanc, 1998; Fourman *et al.*, 1993):

- Presença de não mais que 0,1% da dose limite; 1/1000 ou a milésima parte da dose diária mínima do contaminante pode aparecer na dose diária máxima do produto subsequente. Para o caso de produtos orais é aceitável 0,001, ou seja 0,1% da dose limite. Assim o factor de segurança para este caso é igual a 0,001.
- Não mais que 10ppm do contaminante no produto subsequente.
- Nenhuma quantidade de resíduo deve ser visível após a execução do procedimento de limpeza.

A seguir estão as fórmulas utilizadas para cálculos destes critérios:

CRITÉRIO 1: 0,1% DA DOSE LIMITE (PRODUTOS ORAIS)

Passo A: Determinação do limite de aceitação máximo em µg do contaminante no produto subsequente.

$$A = \frac{0,001 \times MTD_{CONT} \times MBS_{SUBS}}{M_{AX}TD_{SUBS}}$$

Equação 1.12

0,001 = Factor de segurança (este factor pode variar em alguns casos, por exemplo, para produtos injectáveis é 0,0001 (0,01% da dose limite) e para produtos tópicos é 0,01 (1% da dose limite).

MTD_{CONT} = Dose terapêutica mínima diária do contaminante

MBS_{SUBS} = Tamanho mínimo do lote subsequente

MAXTD_{SUBS} = Dose terapêutica máxima diária do lote subsequente

No caso da solução de limpeza, como a MTD_{CONT} não é conhecida, utiliza-se o NOEL (Nível de Efeito Não Observado). O NOEL substitui os termos “0,001 x MTD_{CONT}” no cálculo do Passo A e é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{NOEL} = \text{LD}_{50} \times (5 \times 10^{-6})$$

Equação 1.13

$$\text{ADI} = \text{NOEL} \times \text{BW}$$

Equação 1.14

LD₅₀ = é a quantidade de uma substância química que quando é administrada numa única dose por via oral, expressa em massa da substância por massa de animal, produz a morte de 50% dos animais expostos. É expressa em mg/Kg.

5x10⁻⁶ = Constante empírica

ADI = ingestão diária aceitável (*acceptable daily intake*)

BW = Peso médio de uma pessoa adulta em kg (70kg)

Passo B: Determinação do limite de aceitação do contaminante por área compartilhada (µg/cm²).

$$B = \frac{A}{\text{ESA}}$$

Equação 1.15

A = Limite de aceitação máximo em µg do contaminante no produto subsequente, que é o valor calculado no passo A.

ESA = Área superficial do equipamento em cm².

Passo C: Determinação do limite de aceitação do contaminante na amostra analisada (µg/mL).

$$C = \frac{B \times \text{SSA}}{\text{volume}}$$

Equação 1.16

B = Limite de aceitação do contaminante por área compartilhada, que é o valor calculado no passo B.

SSA = área superficial de amostragem (No caso de água de enxaguamento é toda área compartilhada. Já no caso de *swab* é a área amostrada. Deve ser expressa em cm².)

Volume = No caso de água de enxaguamento é o volume utilizado para enxaguar. Já no caso de *swab* é o volume utilizado na recuperação do *swab*. Deve ser expressa em mL.

CRITÉRIO 2: O LIMITE DE ACEITAÇÃO DE 10 PPM DO PRODUTO CONTAMINANTE NO PRODUTO SUBSEQUENTE

Nos cálculos, somente o passo A se altera, passando a ser:

$$A = 10 \times MSB_{SUBS}$$

Equação 1.17

10 = Representa o limite de aceitação 10ppm (µg/mL ou µg/g)

MBS_{SUBS} = Tamanho mínimo do lote subsequente

Os passos B e C são calculados da mesma maneira conforme citado no critério 1.

A adoção do limite de 10ppm para equipamentos não dedicados é justificada apenas no caso em que o limite baseado em dose terapêutica (0,01% da dose limite) seja mais alto, pois mesmo que os limites altos sejam justificáveis, a sua adoção foge à lógica dos GMP. O limite de 10ppm também pode ser adoptado no caso de equipamentos dedicados onde não é possível calcular 0,01% da dose limite.

CRITÉRIO 3 – INSPEÇÃO VISUAL

A inspecção visual pode permitir a detecção de contaminação grosseira concentrada em pequenas áreas que poderia passar despercebida por amostragem e / ou análise. Tais critérios são aplicáveis aos resíduos de produtos e de agentes de limpeza. Recomenda-se, a aplicação do mais severo entre os três critérios, sendo que o critério "visualmente limpo" deve ser incluído em todos os procedimentos de limpeza executados, excepto naqueles em que a limpeza não pode ser verificada visualmente.

O critério de aceitação estabelecido para os níveis de contaminantes na amostra deve ser prático, viável e de possível verificação. A justificativa para os limites estabelecidos deve ser lógica e baseada no conhecimento dos materiais envolvidos.

Os limites podem ser expressos como a concentração num produto subsequente (µg/mL) ou num limite por área de superfície (µg/cm²). A validação do processo de limpeza evidência que o procedimento de limpeza aprovado resultará num equipamento adequadamente limpo para o uso. Desta forma, como em toda validação, são necessários os protocolos e relatórios de validação.

Segundo o ICH Q7 (2000), para esta validação o protocolo deve descrever o equipamento a ser limpo, procedimentos de validação, materiais, critérios de aceitação, parâmetros que devem ser controlados e monitorizados e o método analítico escolhido. O protocolo deve também indicar os tipos de amostras a serem obtidas e como elas serão recolhidas.

Um processo de limpeza validado deverá ser executado somente por pessoas qualificadas. Todas as não conformidades ocorridas durante o processo de limpeza devem ser registadas. De acordo com a regulamentação no mínimo três aplicações consecutivas do procedimento de limpeza devem ser executadas demonstrando sucesso para que o procedimento possa ser considerado validado.

Novos processos de limpeza devem ser validados antes da sua utilização. A revalidação deve ser realizada periodicamente quando não houver mudança significativa no processo, ou seja, quando o *status* de validação for mantido. No caso de revalidação, deve-se realizar apenas uma corrida dos ensaios descritos. Revalidações periódicas podem ser substituídas, quando apropriado, pela avaliação periódica dos dados e informações que assegurem o cumprimento dos requisitos estabelecidos (FDA, 2004). Em caso de solicitação de mudança, quando é detectada alguma alteração crítica no processo de limpeza, este deve ser novamente validado antes da implementação da mudança e nesta validação devem ser realizadas pelo menos três corridas, com resultados satisfatórios. (FDA, 1993)

Para processo de limpeza são consideradas alterações críticas:

- mudança da composição do agente de limpeza ou da sua concentração sem estudo de equivalência de acção;
- diminuição no tempo de contacto com o agente de limpeza;
- diminuição no número ou tempo de enxaguamento;
- inclusão de novo equipamento, material e/ou instalação ou alteração das suas características ou composição
- inclusão de novo produto (contaminante) considerado mais crítico do que aquele já validado em relação à solubilidade e/ou concentração.

As actividades de análise crítica, avaliação e revalidação deverão ser documentadas.

1.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

Existe uma variedade de métodos analíticos que podem ser utilizados para efectuar a validação do processo de limpeza. A natureza química do resíduo a ser medido possui relevância para a escolha do método analítico. Esta natureza química inclui entre outras, se o resíduo é orgânico ou inorgânico e se é solúvel em água ou noutros solventes (LEBLANC, 2000). Podem ser utilizados métodos específicos ou não específicos.

Os métodos específicos incluem métodos cromatográficos (por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC, cromatografia gasosa - GC e cromatografia de camada fina - TLC, electroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE) e espectrometria de absorção atómica. No entanto, a afirmação de que se deve abordar a Selectividade do método analítico utilizado, foi por vezes mal interpretada com o significado de que apenas um método específico podia ser usado. Não está claro o fundamento desta afirmação, mas muito provavelmente veio de uma incorrecta interpretação de outra posição da FDA sobre métodos analíticos. No início da validação de processo de limpeza algumas empresas apenas analisavam água de enxaguamento e utilizavam especificações farmacopeicas, como a USP. Caso a água de enxaguamento cumprisse a especificação da farmacopeia, a validação de limpeza era considerado como um processo bem sucedido. O FDA fez objecções a isto por várias razões. Uma delas foi o facto, da especificação não possuir relação com a ausência ou presença de resíduo de produto. Por exemplo, o resíduo de um activo potente poderia estar presente na água de enxaguamento em quantidade inaceitável e esta água iria cumprir as especificações (LE BLANC, 2000).

A FDA indicou que queria algo que pudesse medir realmente as espécies alvo. O método específico é uma maneira de fazer isso. No entanto, uma segunda maneira é utilizar um método não específico. Métodos não específicos são geralmente métodos que medem uma propriedade bruta que resulta das contribuições de uma variedade de espécies químicas. Como exemplos tem-se o método de medição do carbono orgânico total (TOC), pH, condutividade e espectrofotometria no ultravioleta (UV). Neste caso, cada método fornece uma medida de uma propriedade geral, mas não fornece nenhuma informação quanto à natureza química, por exemplo, da fonte carbono orgânico. Quando um método não específico é utilizado para medição de resíduo de produto, é necessário fazer algumas suposições sobre o que essa propriedade não-específica representa. Isso geralmente envolve a expressão da propriedade como se toda a propriedade medida fosse devido ao resíduo de produto.

O caso da análise de TOC pode ser utilizado como exemplo onde o valor de TOC é expresso como se todos os átomos de carbono presentes fossem provenientes da espécie orgânica de resíduo de produto. Sabe-se que o carbono orgânico medido não é apenas devido aos activos orgânicos, podendo ter outras contribuições como a do agente de limpeza e excipientes. Isto seria considerado um “pior caso” e tem-se base científica que permite o uso de TOC para chegar a tal conclusão, pois o objectivo é determinar que o valor medido seja inferior ao critério de aceitação calculado.

Uma desvantagem do uso do método não específico é se o valor encontrado for maior que o critério de aceitação calculado, pois não se pode afirmar que o resíduo de produto está acima do especificado uma vez que as contribuições de outras substâncias podem estar a incrementar este valor.

Devem ser utilizados métodos analíticos validados com sensibilidade para detectar resíduos do produto ou contaminantes (ICH Q7, 2000). A metodologia analítica utilizada deve prover uma medida que seja correlacionável a uma concentração do contaminante. Deve existir um trabalho de validação para a metodologia aplicada na validação de limpeza.

1.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A separação de substâncias pode ser realizada por diversos métodos que se baseiam nas suas diferentes propriedades físico-químicas. É um método físico-químico de resolução de componentes de misturas que depende da diferença entre o comportamento dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. A interação dos componentes da mistura com as duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares, incluindo iônica, bipolar, apolar, e efeitos de afinidade e solubilidade específicos.

A cromatografia é um poderoso método de separação com aplicação em todos os ramos da ciência que abrange um diversificado e importante conjunto de métodos que possibilitam a separação de componentes muito semelhantes de misturas complexas que com outros métodos seria impossível. Foi inventada e denominada pelo botânico russo Mikhail Twett no início do século XX.

Nas separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma “fase móvel”, que é um líquido, que obriga a passagem da amostra através de uma “fase estacionária” imiscível fixa, colocada na coluna ou superfície sólida. Na escolha das duas fases, o objectivo é que as mesmas permitam que os componentes da amostra se distribuam em ambas com diferentes graus, garantindo, deste modo, a separação das substâncias. A separação ocorre em forma de bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente.

Um equipamento de HPLC é constituído por um sistema de bomba, um injector, uma coluna cromatográfica (eventualmente termostatada), um detector e um sistema de obtenção de dados (um integrador ou um registador). A fase móvel que sai de um ou vários reservatórios, circula através da coluna, em geral, a fluxo constante, chegando em seguida ao detector. Quando um detector que responde à concentração do soluto for colocado no fim da coluna e o seu sinal for representado num gráfico em função do tempo (ou do volume de fase móvel adicionada), obtém-se uma série de sinais. Este gráfico designa-se cromatograma e fornece informações úteis para análise qualitativa e quantitativa. As posições dos sinais no eixo do tempo podem identificar os componentes da amostra. As áreas sob os sinais dão uma medida quantitativa de cada componente da amostra (por comparação da altura ou da área do pico obtido com o analito com a de um ou mais substâncias de referência).

A cromatografia líquida de alta eficiência é bastante aplicada, na indústria, nomeadamente na farmacêutica, e em investigação, devido à sua sensibilidade (desde 10^{-6} ppm), fácil adaptação para determinações quantitativas exactas, adequabilidade à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis e, principalmente, à sua ampla aplicabilidade a uma vasta gama de substâncias. (Farmacopeia Portuguesa; Farmacopeia Europeia)

1.5.2 Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC)

Um dos instrumentos utilizados para desenvolvimento deste trabalho foi o analisador de TOC, pertencente a um laboratório subcontratado para efectuar as respectivas análises de amostras de agente de limpeza.

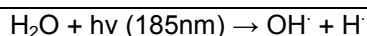
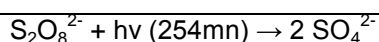
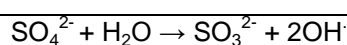


FIGURA 1.9 - Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC)

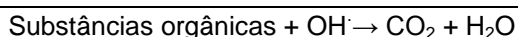
Este instrumento fornece a determinação indirecta de TOC e baseia-se na oxidação do carbono orgânico presente na amostra a CO_2 e posterior medida deste por condutividade (Furlong *et al.*, 1999). A reacção de oxidação ocorre pelo uso de uma solução de persulfato de amónio em meio de ácido fosfórico.

Após a entrada da amostra no sistema, o ácido é injectado até reduzir o pH para 2,0. A amostra acidificada é combinada com o oxidante para promover oxidação das substâncias orgânicas. A amostra é conduzida através do homogeneizador até chegar ao divisor de fluxo. A amostra então é dividida em duas partes iguais. Uma é processada para a determinação de carbono inorgânico total (IC) e a outra é processada para determinação de carbono total (TC). A amostra IC é enviada directamente para o sensor de CO_2 para determinação de carbono inorgânico total. Existem dois sensores de CO_2 que medem a concentração desta substância por condutividade. Um dos sensores mede a concentração de CO_2 na amostra sem oxidação (sensor de carbono inorgânico) e o outro mede a combinação da concentração inicial de CO_2 com aquele produzido pela oxidação das substâncias orgânicas (sensor de carbono total).

A amostra de carbono total passa por um reactor de oxidação onde é exposta à luz UV. A combinação da luz UV e o persulfato de amónio oxida os componentes orgânicos na amostra, convertendo o carbono a CO₂. O reactor é um tubo de quartzo espiral que envolve a lâmpada UV. A lâmpada UV emite radiação de 185 nm e 254 nm resultando na formação de uma reacção química que resulta em agentes na forma de radicais hidroxilo produzidos através das fotodecomposições da água e do persulfato como mostrado abaixo:

**Equação 1.18****Equação 1.19****Equação 1.20**

O radical hidroxilo (OH[·]) completará a oxidação dos componentes orgânicos, convertendo o átomo de carbono do componente orgânico em CO₂.

**Equação 1.21**

O CO₂ é então analisado pelo sensor de carbono total por meio da determinação da condutividade. A concentração de carbono orgânico total é então determinada pelo instrumento através da diferença da concentração de carbono total (TC) e carbono inorgânico (IC) (Miller et al., 1997)

Devido às análises de carbono orgânico total (TOC) não serem específicas, é necessário que sejam recolhidas amostras de água de enxaguamento após o uso de cada um dos seus componentes de limpeza. Outro ponto importante é a preparação do material de recolha, pois devido a falta de Selectividade, qualquer contaminante interfere na análise. Uma boa forma de preparar este material é inicialmente usar um detergente comum, enxaguar intensivamente com água purificada (água Milli-Q ou similar), enxaguar com solução de peróxido de hidrogénio 3% e novamente enxaguar bastante com água purificada, e finalmente deixar todo o material protegido de contaminantes externos.

Deve-se também, no momento da análise, recolher um branco com a água que se utilizou para amostrar o resíduo, recolhida directamente do ponto de uso, para descontar o valor de carbono orgânico total (TOC) desta água das demais amostras analisadas.

A água ultrapura utilizada nos reservatórios do equipamento, bem como na preparação dos padrões e diluição de amostras deve ser livre de impurezas, principalmente da presença de qualquer tipo de carbono que possa influenciar no resultado da análise. As amostras devem ser recolhidas e armazenadas preferencialmente em recipientes de vidro ou de polietileno de alta densidade. A amostragem ou armazenamento de amostras em recipientes plásticos como os de polietileno convencionais somente é permitido se for garantido que o recipiente não

contribui para a contaminação orgânica das amostras. Devido à possibilidade de oxidação ou decomposição bacteriana de alguns componentes das amostras aquosas, o tempo entre a recolha das amostras e o início das análises deve ser minimizado. Além disso, as amostras devem ser mantidas refrigeradas (4°C) e protegidas da luz solar e oxigénio atmosférico.

O uso do equipamento de carbono orgânico total (TOC) para a determinação de resíduos em validação de limpeza tem aumentado. O seu uso é possível, no entanto, a metodologia criada deve ser validada como qualquer outra, nos mesmos parâmetros, e o limite de aceitação estabelecido deve ser correlacionado a um valor determinado de TOC, não sendo aceitáveis, portanto, valores empíricos, pois tais valores não podem por si só estabelecer uma correlação com a concentração do contaminante. Além disso, para análises em equipamentos de TOC é necessário que os compostos sejam solúveis em água, sendo por este motivo geralmente mais utilizado para resíduos de detergentes, que são plenamente solúveis em água.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação de comprimidos de dexametasona

2.1.1 Equipamentos

O presente estudo de validação de limpeza de equipamentos, pressupõe a produção prévia de comprimidos de dexametasona 8mg, seguida da produção de comprimidos de dexametasona 1mg. Neste sentido, no fluxograma abaixo apresentado, identificam-se as operações unitárias e de forma sequencial, assim como os equipamentos a utilizar durante o processo de fabrico destes comprimidos.

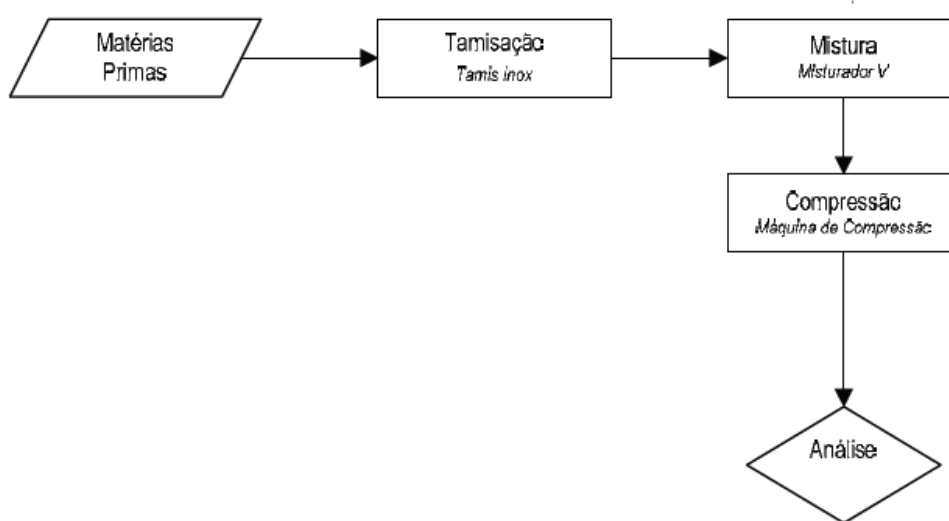


FIGURA 2.1 - Fluxograma simplificado do processo de fabrico de comprimidos de dexametasona

A abordagem que se seguiu durante o desenvolvimento de método analítico e validação de limpeza dos equipamentos, Misturador em V e Máquina de Comprimir RIVA PICCOLA, usadas neste processo de fabrico e cujo uso não é dedicado, incluiu os seguintes pontos:

SELECÇÃO DE INDICADORES

Substância Activa: A dexametasona foi a substância activa seleccionada como indicador, dada a sua elevada toxicidade e baixa solubilidade (*worst case*). (Caracterização mais detalhada no ponto 1.1.2) (MARTINDALE, 2004)

Detergente: O P3-cosa PUR 80 foi o surfactante seleccionado como agente de limpeza. A selecção do agente de limpeza deve ser baseada na solubilidade do activo escolhido (dexametasona), compatível com os equipamentos e não deve causar problemas ambientais. Este detergente é aplicável como produto de lavagem ou como aditivo a soluções de limpeza alcalino ou ácidas. É indicado para limpeza manual de equipamentos, acessórios e peças

desmontáveis. É compatível com aço inox, cromados, bronze e cobre, plásticos e vidro (ECOLAB, *Food & Beverage Division*).

TABELA 2.1 - Propriedades físico-químicas do detergente P3-cosa PUR 80 (ECOLAB, Ficha de dados segurança, 2011)

Propriedade físico-química	
Aspecto	Líquido amarelo transparente
Solubilidade	A 20°C em todas as proporções
pH	9,5-9,9
Densidade	1 – 1,04 g/cm ³ (20°C)
LD ₅₀ (mg/kg)	1250

O objectivo principal deste trabalho irá incidir sobre a validação de método de limpeza para a substância activa (dexametasona), contudo serão efectuados todos os cálculos, não só para a determinação de limites de substância activa, como também para o agente de limpeza. Os resultados obtidos para o agente de limpeza serão importantes no sentido de iniciar um estudo preliminar para uma posterior validação de limpeza, podendo deste modo ter-se a noção da sensibilidade da técnica escolhida (TOC).

A estratégia de limpeza de cada um dos equipamentos adoptada neste trabalho, pressupõe a existência de procedimentos operacionais escritos (procedimentos internos do LEF). Vamos neste sentido apresentar um breve resumo dos mesmos.

2.1.1.1 Limpeza do Misturador em V Filtra

O Misturador em V FILTRA / FTLMV-08 foi fornecido pela Farmacoop, com 8 L de volume total e dimensões de 80 cm de altura (Figura 2.2). A área de superfície de contacto deste equipamento com o produto é de 2550 cm². É um equipamento universalmente utilizado para a mistura de pós/grânulos com elevada eficiência. O equipamento é formado por uma base de suporte à qual está ligado um suporte em forma de U, contendo um veio entre os dois braços que por sua vez suporta o misturador em V. Este veio está acoplado a um motor eléctrico que faz girar o misturador em V. O misturador em V é de aço inox (AISI 316) e é formado por dois segmentos cilíndricos os quais confluem num só segmento cilíndrico com o mesmo calibre, em cuja extremidade existe uma boca de carga/descarga, tapada com uma tampa metálica de abertura por deslizamento lateral. Os dois braços cilíndricos opostos à boca de carga/descarga, estão tapados nas suas extremidades por duas tampas de silicone. O interruptor da corrente eléctrica e o temporizador de operação estão situados no braço esquerdo do suporte e o cabo de alimentação eléctrica está situada na retaguarda deste braço. A alimentação do misturador é feita pela boca de carga, com o misturador na vertical com a boca para cima. A descarga é feita com o misturador na vertical com a boca para baixo. Quando em movimento, o material

circula por acção gravítica, entre os dois braços do misturador e o braço de confluência, originando a sua mistura.



FIGURA 2.2 - Imagem do equipamento Misturador em V Filtra utilizado na validação

a) Procedimento de limpeza

A limpeza do Misturador em V Filtra FTMV-08 é executada através de um processo manual, sem desmontagem do equipamento.

Pré-Lavagem (na sala de produção)

- Desligar o equipamento da tomada;
- Retirar as tampas de silicone, o parafuso, a tampa da boca de descarga e o respectivo vedante de borracha;
- Colocar o misturador com a boca de descarga para baixo, estender um papel vegetal por baixo e retirar com um papel absorvente a maior parte dos resíduos acumulados nas paredes do misturador. Seguidamente aspirar todo o equipamento de cima para baixo, de forma a eliminar os resíduos de produto remanescentes, incluindo as tampas de silicone e a ranhura circular do vedante da tampa de descarga.

Lavagem

- Dobrar o papel vegetal com o papel absorvente no seu interior, utilizados na pré-lavagem para recolha de resíduos e colocá-los no recipiente de resíduos contaminados. Transferir o equipamento, e os respectivos acessórios para a sala de lavagens;

- Colocar um recipiente de grande capacidade (5L ou superior) por baixo da boca de descarga e colocar no seu interior os acessórios do equipamento para um primeiro enxaguamento;
- Com uma mangueira de pequeno calibre (tubo de silicone) enxaguar o interior e o exterior do equipamento de modo que a água seja recolhida no recipiente colocado na boca de descarga;
- Esfregue com papel *wypall* humedecido em detergente 1%, todas as superfícies do equipamento, o interior e o exterior das tampas de silicone e da tampa de descarga e respectivo parafuso e vedante. Lave as tampas e os acessórios em 5 litros de água purificada 2 vezes e ponha-os a escorrer por cima de um papel absorvente para secagem ao ar.

Enxaguamento

- Enxaguar com 5 litros de água purificada, de cima para baixo, o interior e o exterior do equipamento de modo a retirar os resíduos de detergente. Deixar escorrer o primeiro enxaguamento para o recipiente de recolha;
- Enxaguar de novo o interior do equipamento com 3 litros de água (último enxaguamento);
- Volume de recolha de amostra: 250 mL.

Sanitização

- Passar o interior do equipamento e os respectivos acessórios com um papel *wypall* embebido em álcool a 70°. Montar o equipamento;
- Passar o exterior do equipamento com papel *wypall* embebido em álcool 70°.

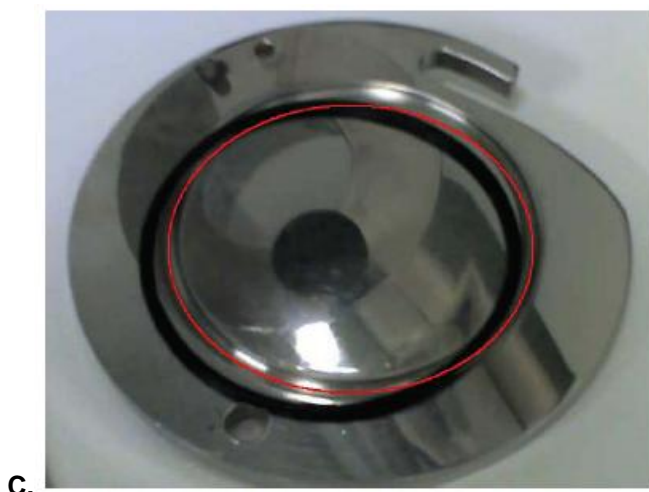
b) Pontos de amostragem



A.



B.



C.

FIGURA 2.3 - A. Anel de descarga (Aço inox); B. Tampas de silicone (Silicone); C. Friso da tampa de descarga (Aço inox)

TABELA 2.2 – Áreas do Misturador em V a ser amostradas

Parte	Área aproximadamente amostrada	Justificação para amostragem (<i>swab</i>)	Modo de amostragem
A	25cm ²	Área de difícil limpeza/Acesso	Recolher a amostra descrevendo uma circunferência com o <i>swab</i> , na superfície interna da zona de descarga
B	25cm ²	Área de difícil limpeza/Acesso	Passar com o <i>swab</i> descrevendo uma circunferência na base da tampa
C	25cm ²	Área de difícil limpeza/Acesso	Passar com o <i>swab</i> no friso de encaixe da borracha

a) Cálculo de Limites e Critérios de Aceitação

INSPECÇÃO VISUAL E OLFATIVA

O equipamento deve ser submetido a uma inspecção visual e olfativa. Esta inspecção é uma verificação qualitativa do processo de limpeza e deve ser realizada antes de passar o *swab* (esfregaço).

Depois do equipamento ser limpo segundo o procedimento de limpeza estabelecido, deve ficar visualmente limpo, seco e qualquer odor relacionado com o produto ou com o agente

de limpeza deve estar ausente. Posteriores amostragens ao equipamento não deverão ter lugar se os requisitos visuais e olfactivos de limpeza não estiverem preenchidos. As zonas externas do equipamento devem também ser limpas apesar de não estarem em contacto com o produto.

CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO: O equipamento deve estar visualmente limpo, seco e isento de odores detectáveis.

Considerando as duas técnicas de amostragem mencionadas no capítulo anterior, por enxaguamento e/ou *swab*, é importante referir uma vez mais que a técnica de *swab* deverá ser sempre usada nas áreas de difícil limpeza. Neste sentido, a escolha do *swab* é também um ponto de especial importância antes de se iniciar o desenvolvimento de método analítico.

Deste modo, os cálculos serão efectuados para ambos os processos de amostragem e os resultados das duas técnicas serão comparados, no sentido de seleccionar um *worst case* e assim ser feita a escolha do procedimento de amostragem a realizar em cada um dos equipamentos, para o resíduo químico e agente de limpeza respectivamente.

ANÁLISE DE RESÍDUOS QUÍMICOS (DEXAMETASONA) E DE AGENTE DE LIMPEZA

O objectivo desta análise é verificar que após os procedimentos de limpeza, os níveis de contaminação de substância activa e do agente de limpeza presentes, cumprem com os critérios de aceitação pré-definidos.

i) Cálculo de limites de aceitação para a substância activa (Dexametasona)

Neste trabalho, o critério de aceitação para resíduos da substância activa, depois da limpeza, baseou-se na comparação entre a contaminação máxima admissível do activo anterior (*Maximum allowable carryover*, MAC_A) com um factor de segurança de 0,001 (factor de segurança fundamentado no risco da forma farmacêutica) e o critério de 10ppm, seleccionando-se o menor dos dois para critério de aceitação.

CRITÉRIO 1: CÁLCULO DO LIMITE DA CONTAMINAÇÃO MÁXIMA ADMISSÍVEL DO ACTIVO ANTERIOR (A) (“MAXIMUM ALLOWABLE CARRYOVER”- MAC_A)

Não mais do que 0,001 da dose terapêutica mínima diária (MTD_{CONT}) da substância activa (A) dos comprimidos de dexametasona 8mg (contaminante), pode contaminar a toma máxima diária ($MaxTD_{SUBS}$) do lote de fabrico subsequente (MBS_{SUBS}), dexametasona 1g. Os cálculos foram efectuados usando a equação 1.12 descrita no ponto 1.4.4.

$$MAC_A = \frac{0,001 \times MTD_{CONT} \times MBS_{SUBS}}{M_{AXTD_{SUBS}}}$$

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

A - substância activa

MTD_{CONT} - dose terapêutica mínima diária do contaminante (mg)

MBS_{SUBS} - tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

MaxTD_{SUBS} - dose terapêutica máxima diária do lote subsequente (kg)

CRITÉRIO 2: CÁLCULO DO LIMITE DE ACEITAÇÃO DE 10PPM DO PRODUTO CONTAMINANTE NO PRODUTO SUBSEQUENTE

Não mais do que 10 ppm da substância activa (A) pode contaminar o lote de fabrico subsequente (MBS_{SUBS}). Os cálculos foram efectuados usando a equação 1.15 descrita no ponto 1.4.4.

$$10ppm_A = 10_{(mg/kg)} \times MBS_{SUBS}$$

(Nota: 10 ppm = 10 mg/Kg)

A - substância activa

MBS_{SUBS} – tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

A partir do resultado obtido, calcula-se a quantidade de substância activa presente na superfície do equipamento por amostra, que poderá estar em contacto com o produto através da seguinte fórmula:

Amostragem por Swab	$MAC_A/amostra = \frac{MAC_A \times SSA}{ESA}$
	$10ppm_A/amostra = \frac{10ppm_A \times SSA}{ESA}$

Equação 2.1

Equação 2.2

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

A - substância activa

SSA - área da superfície do equipamento onde se efectuou a amostra (cm²)

ESA - área total da superfície de contacto do equipamento com o produto (cm²)

10 ppm – limite de aceitação de 10 ppm (mg)

TABELA 2.3 - Dados necessários para cálculo dos limites de aceitação

Tipo de dado / Informação	Dado / Informação
A = Substância activa a limpar	Dexametasona
MTD_{CONT} = Dose Terapêutica Mínima Diária do contaminante (mg)	0,5 (Martindale)
MaxTD_{SUBS} = Dose Terapêutica Máxima Diária do lote subsequente (kg)	0,003 (Martindale)
SSA = Área superficial amostrada (swab) (cm²)	Anel de descarga 25 Tampas de silicone 25 Friso da tampa de descarga 25
ESA = Área superficial do equipamento (cm²)	2550
MBS_{SUBS} = Tamanho mínimo do lote subsequente (Kg)	4

TABELA 2.4 - Tabela de cálculo do limite de aceitação para o activo

Nome do Produto	Substância Activa	MTD _{CONT} (mg)	MBS _{SUBS} (kg)	MaxTD _{SUBS} (kg)	MAC _A (mg)	10ppm (mg)
Comprimidos de Dexametasona a 8mg	Dexametasona	0,5	4	0,003	0,67	40

SSA (cm ²)	ESA (cm ²)	MAC/amostra (mg/amostra)	10ppm/amostra (mg/amostra)	Limite de aceitação/amostra mg/amostra	Conc. (µg/mL)
25	2550	0,0065	0,3922	0,0065	0,65¹⁾

¹⁾A preparação de amostra de swab será feita para um volume final de 10mL. Factor de conversão para µg/mL=1000

MTD_{CONT} - dose terapêutica mínima diária do contaminante (mg)

MBS_{SUBS} - tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

MaxTD_{SUBS} - dose terapêutica máxima diária do lote subsequente (kg)

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

A - substância activa

10 ppm – limite de aceitação de 10ppm (mg)

SSA - área da superfície do equipamento onde se efectuou a amostra (cm²)

ESA - área total da superfície de contacto do equipamento com o produto (cm²)

ii) Cálculo de limites de aceitação para o Agente de Limpeza

O critério de aceitação para o agente de limpeza (contaminação máxima admissível no fabrico subsequente, MAC_x) é baseado no nível de toxicidade oral, limite de detecção do método de quantificação validado e/ou dados gerados durante os estudos de certificação. O critério de aceitação será calculado através da equação seguinte e será relacionado com a área superficial de todo o equipamento (ou sequência de equipamentos). A informação e os dados necessários para o cálculo do limite de aceitação são apresentados na tabela 2.5.

CRITÉRIO 1: CÁLCULO DO LIMITE DA CONTAMINAÇÃO MÁXIMA ADMISSÍVEL DO AGENTE DE LIMPEZA (X) (“*MAXIMUM ALLOWABLE CARRYOVER*”-MAC_x)

A quantidade de activo que pode ser consumida diariamente sem qualquer efeito tóxico é chamada de *No Observable Effect Level*, ou NOEL. Este valor é obtido multiplicando LD₅₀ por um factor de 5x10⁻⁶. O resultado obtido por peso médio de um indivíduo, permite obter a ingestão diária aceitável (*acceptable daily intake*, ADI) (Layton *et. Al.*, 1987). O ADI permite uma larga margem de segurança, que corresponde a uma estimativa da quantidade de resíduos, expressa em µg/kg ou mg/kg de peso corporal, susceptível de ser ingerida diariamente durante toda a vida sem provocar riscos significativos para a saúde humana.

Os cálculos foram efectuados usando a equação 2.3 a 2.5.

$MAC_X = \frac{ADI \times MBS_{SUBS}}{MaxTD_{SUBS}}$	Equação 2.3
$ADI = NOEL_X \times BW$	Equação 2.4
$NOEL_X = LD_{50} \times 5 \times 10^{-6}$	Equação 2.5

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

X – agente de limpeza (detergente)

ADI = ingestão diária aceitável (*acceptable daily intake*)(mg)

MBS_{SUBS} - tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

MaxTD_{SUBS} - dose terapêutica máxima diária do lote subsequente (kg)

NOEL - Dose sem efeito observável (mg/kg)

BW - peso corporal médio (*medium body weight*) (70Kg)

LD₅₀ - dose ou concentração em que 50% dos organismos submetidos ao teste morrem

5x10⁻⁶ - factor empírico desenvolvido por Layton (Layton *et. Al.*, 1987)

CRITÉRIO 2: CÁLCULO DO LIMITE DE ACEITAÇÃO DE 10PPM DO PRODUTO CONTAMINANTE NO PRODUTO SUBSEQUENTE

Não mais do que 10ppm do agente de limpeza (X) pode contaminar o lote de fabrico subsequente (MBS_{SUBS}). Os cálculos foram efectuados usando a equação 1.15 descrita no ponto 1.4.4.

$$10ppm_x = 10_{(mg/kg)} \times MBS_{SUBS}$$

(Nota: 10 ppm = 10 mg/Kg)

A - substância activa

MBS_{SUBS} – tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

A partir do resultado obtido, calcula-se a quantidade de agente de limpeza presente na superfície do equipamento por amostra, que poderá estar em contacto com o produto através da seguinte fórmula:

Amostragem por Swab	$MAC_X/amostra = \frac{MAC_X \times SSA}{ESA}$	Equação 2.1
	$10ppm_X/amostra = \frac{10ppm_X \times SSA}{ESA}$	Equação 2.2
Amostragem por enxaguamento	$MAC_X/amostra = \frac{MAC_X \times SSA}{ESA} \times \frac{Vol. amostra de enxaguamento}{Vol. último enxaguamento}$	Equação 2.3

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

X – agente de limpeza (detergente)

SSA - área da superfície do equipamento onde se efectuou a amostra (cm²)

ESA - área total da superfície de contacto do equipamento com o produto (cm²)

10 ppm – limite de aceitação de 10ppm (mg)

TABELA 2.5 - Dados necessários para cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza

Tipo de dado / Informação	Dado / Informação
Agente de limpeza=Solução de P3-Cosa PUR 80 a 1%	P3-Cosa PUR 80
Indicador (X)	Agente de limpeza (Detergente)
LD ₅₀ (mg/kg) ⁽¹⁾	1250 ⁽²⁾ (dado obtido no fornecedor do agente de limpeza)
NOEL (mg/kg)= Dose sem efeito observável	0,0063 (valor calculado)
BW (kg)= Peso corporal médio (<i>medium body weight</i>)	70
ADI (mg)= ingestão diária aceitável "acceptable daily intake"	0,4375 (valor calculado)
MaxTD _{SUBS} = Dose Terapêutica Máxima Diária do lote subsequente (kg)	0,003
SSA= Área superficial amostrada (cm ²)	25 (swab) 2550 (enxaguamento)
ESA = Área superficial do Equipamento (cm ²)	2550
MBS _{SUBS} = Tamanho mínimo do lote subsequente (Kg)	4
Volume total do último enxaguamento (ml)	3000
Volume de amostra recolhido (enxaguamento) (ml)	250

⁽¹⁾LD₅₀ - dose ou concentração em que 50% dos organismos submetidos ao teste morrem

⁽²⁾Ligeiramente tóxico (classificação segundo United States Environmental Protection Agency– EPA)

CÁLCULO DO LIMITE DE ACEITAÇÃO PARA O ENXAGUAMENTO (RINSE)**TABELA 2.6** - Cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza num processo de enxaguamento

Nome do Agente de Limpeza	Substância química	LD ₅₀ (mg/kg)	NOEL _x (mg/kg)	ADI
P3 CosaPur 80	-	1250	0,0063	0,4375

MBS _{SUBS} (kg)	MaxTD _{SUBS} (kg)	MACx (mg)	Vol. Amostra (mL)	Vol. último Enxaguamento (mL)	10ppm (mg)	SSA (cm ²)	ESA (cm ²)	MAC /amostra (mg/amostra)	10ppm / amostra (mg/amostra)	Conc (µg/mL)
4	0,003	583,33	250	3000	40	2550 ⁽¹⁾	2550	48,6111	3,3333	13,33

⁽¹⁾O critério de aceitação foi calculado considerando a área superficial total do equipamento.

LD₅₀ - dose ou concentração em que 50% dos organismos submetidos ao teste morrem

NOEL - Dose sem efeito observável (mg/kg)

X – agente de limpeza (detergente)

ADI = ingestão diária aceitável (*acceptable daily intake*)(mg)

MBS_{SUBS} - tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

MaxTD_{SUBS} - dose terapêutica máxima diária do lote subsequente (kg)

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

10 ppm – limite de aceitação de 10ppm (mg)

SSA - área da superfície do equipamento onde se efectuou a amostra (cm²)

ESA - área total da superfície de contacto do equipamento com o produto (cm²)

CÁLCULO DO LIMITE DE ACEITAÇÃO PARA O ESFREGAÇÃO (SWAB)**TABELA 2.7** - Cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza num processo de amostragem por swab

Nome do Agente de Limpeza	Substância química	LD ₅₀ (mg/kg)	NOEL _x (mg/kg)	ADI
P3 CosaPur 80	-	1250	0,00625	0,4375

MBS _{SUBS} (kg)	MaxTD _{SUBS} (kg)	MACx (mg)	10ppm (mg)	SSA (cm ²)	ESA (cm ²)	MAC/amostra (mg/amostra)	10ppm/ amostra (mg/amostra)	Limite de aceitação / amostra mg/amostra	Conc. (µg/mL)
4	0,003	583,33	40	25	2550	5,7190	0,3922	0,3922	39,22 ¹⁾

¹⁾A preparação de amostra de *swab* será feita para um volume final de 10mL. Factor de conversão para µg/mL=1000

LD₅₀ - dose ou concentração em que 50% dos organismos submetidos ao teste morrem (mg/kg)

X – agente de limpeza (detergente)

NOEL - Dose sem efeito observável (mg/kg)

ADI = ingestão diária aceitável (*acceptable daily intake*)(mg)

MBS_{SUBS} - tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

MaxTD_{SUBS} - dose terapêutica máxima diária do lote subsequente (kg)

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

10 ppm – limite de aceitação de 10ppm (mg)

SSA - área da superfície do equipamento onde se efectuou a amostra (cm²)

ESA - área total da superfície de contacto do equipamento com o produto (cm²)

Após análise dos resultados obtidos através dos cálculos efectuados para a determinação dos limites de aceitação no Misturador em V, podemos concluir que:

- para a análise do resíduo químico (dexametasona), cuja amostragem é feita por *swab* (por serem áreas de difícil acesso), será seleccionado o CRITÉRIO 1 (Cálculo do limite da contaminação máxima admissível do activo anterior), para se obter o valor do limite da concentração de activo permitida. Esta selecção justifica-se pelo facto do resultado obtido representar uma situação de *worst case*, ou seja, apresenta maior restrição relativo aos resíduos (0,0065 mg/amostra face a 0,3922 mg/amostra);
- para a análise do agente de limpeza (P3-cosa PUR 80), cuja amostragem poderá ser feita por *swab* ou enxaguamento, será em ambos os processos de amostragem seleccionado o CRITÉRIO 2 (Cálculo do limite de aceitação de 10ppm do produto contaminante no produto subsequente), para se obter o valor do limite da concentração de agente de limpeza permitida. Esta selecção justifica-se pelo facto de obtermos uma situação de *worst case* (enxaguamento:3,3333 mg/amostra e *swab*:0,3922 mg/amostra).

Contudo, tendo em conta o *design* apresentado pelo Misturador em V, no qual o processo de limpeza por enxaguamento é facilitado, foi seleccionado como procedimento de amostragem o enxaguamento.

CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO: Todos os *swabs* de análise de substâncias activas devem cumprir com os limites de contaminação pré-estabelecidos (0,0065 mg/amostra), assim como a análise do agente de limpeza deve cumprir com os limites de contaminação para as amostras de enxaguamento (3,33 mg/amostra).

TABELA 2.8 - Resumo dos limites de aceitação

Procedimento	Análise visual e olfactiva
Método Amostragem	Inspecção visual e olfactiva
Critério de Aceitação	O equipamento deve apresentar-se visualmente limpo, seco e sem odores detectáveis.

Procedimento	Análise de resíduos químicos
Método Amostragem	Esfregaço (<i>swab</i>)
Material	Aço Inox AISI 316 e Silicone
Indicador	Dexametasona
Critério de Aceitação	0,0065 mg/amostra (concentração= 0,65 µg/mL; volume final de amostra 10ml)

Procedimento	Análise de resíduos de agentes de limpeza
Método Amostragem	Enxaguamento (<i>Rinse</i>)
Indicador	Detergente
Critério de Aceitação	3,33 mg/amostra (concentração=13,33 µg/mL; volume de amostra 250ml)

2.1.1.2 Limpeza da máquina de comprimir RIVA PICCOLA

A máquina de comprimir rotativa PICCOLA foi fornecida pela RIVA, representada em Portugal pela firma DT Internacional. É um equipamento universalmente utilizado para o fabrico de comprimidos. O equipamento é formado por uma base de suporte sólida a qual contém o motor e as engrenagens de accionamento do prato. Esta base de suporte possui protecções de acrílico que impedem o acesso do operador ao equipamento quando ele está em funcionamento. Funciona no sentido horário, possui 8 estações de compressão com punções tipo D, com uma força máxima de compressão de 60KN, possui pré-compressão e alimentação forçada, tremonha com sensor de nível de produto, ajustamento do peso e de dureza independentes, sensor de força de compressão e velocidade com variação contínua.

As superfícies de contacto deste equipamento com o produto (área de 3000cm²) são de aço inox AISI 316, e tem uma produção máxima de 28.800 comprimidos por hora. Está associada a uma consola contendo um monitor táctil a partir do qual se faz o controlo do funcionamento do equipamento, se obtêm os alertas de funcionamento e os dados relativos ao fabrico tais como as forças de compressão obtidas. Os comprimidos são libertados por uma rampa lateral com despoeiramento.



FIGURA 2.4 - Imagem do equipamento Máquina de comprimir Riva Piccola utilizado na validação

a) Procedimento de limpeza

A limpeza da Máquina de comprimir Riva Piccola é executada através de um processo manual, com desmontagem do equipamento.

Pré-Lavagem (na sala de produção)

- Desligar o equipamento da tomada;
- Verificar se a tremonha está vazia e desligar o sensor de presença de produto. Se a tremonha tiver pó no interior, retirar a tremonha do encaixe tendo o cuidado de tapar rapidamente a sua extremidade de forma a despejar o pó para um saco de plástico. Colocar as peças que vão sendo retiradas num recipiente destinado a lavagem;
- Desmontar o alimentador e o seu prato de suporte, pondo um saco de plástico largo por baixo de modo a recolher o pó do seu interior. Rodar as estrelas de forma a retirar o pó do seu interior para o saco de plástico;
- Desmontar o colector de comprimidos e as guardas dos punções inferiores;
- Retirar o excesso de pó do equipamento aspirando ou recolhendo-o com uma espátula para um saco de plástico;
- Retirar os vedantes de silicone dos punções inferiores e superiores;
- Aspirar os vestígios de pó acumulados nas diferentes partes da máquina.

Lavagem

- Lavar as peças retiradas, por imersão em água purificada e em seguida lavar individualmente com detergente, tendo o cuidado de aceder aos pontos menos expostos de cada peça;
- Retirar o detergente das peças com água corrente e pô-las a escorrer na bancada de lavagem;
- Iniciar a lavagem da máquina de cima para baixo, passando com papel *wypall* humedecido em água, nas superfícies de modo a recolher o pó existente;
- Lavar as superfícies com papel *wypall* humedecido em detergente (P3 Cosa Pur 80%, solução a 1%) assegurando que se atingem pontos de acesso mais difícil;
- Evitando o escorrimento de água para o interior da máquina, remover o detergente das superfícies da máquina com papel *wypall* molhado em água até não se verificar vestígios de detergente. Repetir uma vez este procedimento de forma a retirar qualquer vestígio de detergente da máquina.

Sanitização

- Passar as peças por álcool a 70º e pô-las a secar ao ar em cima de uma folha de papel absorvente;
- Passar com papel *wypall* embebido em álcool a 70º pelas superfícies lavadas;
- Depois de efectuar as amostragens, montar as peças na máquina colocar as tampas laterais e fechar a tampa de acesso à manivela de accionamento manual;
- Passe um papel *wypall* com óleo alimentar nos punções e nas matrizes e acondicione-os nas caixas próprias.

b) Pontos de Amostragem

TABELA 2.9 - Áreas da máquina de comprimir a serem amostradas

Parte	Área Amostrada	Justificação para amostragem (Swab)
A	25cm ²	Área de difícil limpeza/Acesso
B	25cm ²	Área de difícil limpeza/Acesso
C	25cm ²	Área de difícil limpeza/Acesso
D	25cm ²	Área de difícil limpeza/Acesso
E	25cm ²	Área de difícil limpeza/Acesso

A.



B.



C.



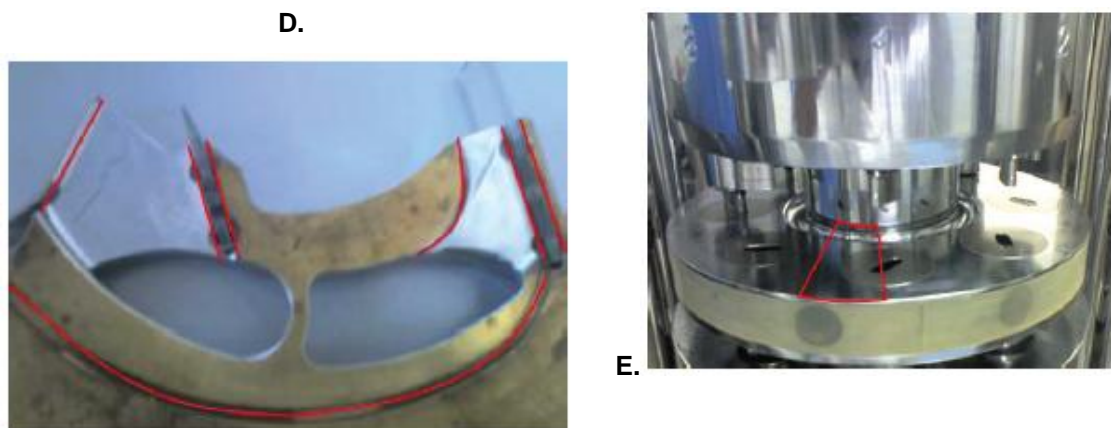


FIGURA 2.5 - Estrelas (Aço inox); B. Cavidade das matrizes (Aço inox); C. Anel de ligação da tremonha ao distribuidor (Aço inox); D. Raspadores do distribuidor (Aço inox); E. Prato (Aço inox)

a) Cálculo de Limites e Critérios de Aceitação

i) Cálculo de limites de aceitação para a Substância activa (Dexametasona)

CRITÉRIO 1: CÁLCULO DO LIMITE DA CONTAMINAÇÃO MÁXIMA ADMISSÍVEL DO ACTIVO ANTERIOR (A) (*MAXIMUM ALLOWABLE CARRYOVER-MAC_A*)

CRITÉRIO 2: CÁLCULO DO LIMITE DE ACEITAÇÃO DE 10 PPM DO PRODUTO CONTAMINANTE NO PRODUTO SUBSEQUENTE

TABELA 2.10 - Dados necessários para cálculo do limite de aceitação

Tipo de dado / Informação	Dado / Informação
A = Substância activa a limpar	Dexametasona
MTD_{CONT} = Dose Terapêutica Mínima Diária do contaminante (mg)	0,5
MaxTD_{SUBS} = Dose Terapêutica Máxima Diária do lote subsequente (kg)	0,003 (Martindale)
SSA = área superficial de amostragem (swab) (cm²)	Estrelas 25 Anel de ligação da tremonha ao Distribuidor 25 Prato 25 Raspadores do distribuidor 25 Cavidades das matrizes 25
ESA = Área superficial do Equipamento (cm²)	3000
MBS_{SUBS} = Tamanho mínimo do lote subsequente (Kg)	4

TABELA 2.11 -Tabela de cálculo de concentração de activo

Nome do Produto	Substância Activa	MTD _{CONT} (mg)	MBS _{SUBS} (kg)	MaxTD _{SUBS} (kg)	MAC _A (mg)	10ppm (mg)
Comprimidos de Dexametasona a 8 mg	Dexametasona	0,5	4	0,003	0,67	40

SSA (cm ²)	ESA (cm ²)	MAC/amostra (mg/amostra)	10ppm/amostra (mg/amostra)	Limite de aceitação/amostra mg/amostra
25	3000	0,0056	0,3333	0,0056¹⁾

¹⁾A preparação de amostra de *swab* será feita para um volume final de 10mL. Factor de conversão para µg/mL=1000

MTD_{CONT} - dose terapêutica mínima diária do contaminante (mg)

MBS_{SUBS} - tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

MaxTD_{SUBS} - dose terapêutica máxima diária do lote subsequente (kg)

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

A - substância activa

10 ppm – limite de aceitação de 10ppm (mg)

SSA - área da superfície do equipamento onde se efectuou a amostra (cm²)

ESA - área total da superfície de contacto do equipamento com o produto (cm²)

ii) Cálculo de limites de aceitação para o Agente de Limpeza

CRITÉRIO 1: CÁLCULO DO LIMITE DA CONTAMINAÇÃO MÁXIMA ADMISSÍVEL DO ACTIVO ANTERIOR (A) (*MAXIMUM ALLOWABLE CARRYOVER-MAC_A*)

CRITÉRIO 2: CÁLCULO DO LIMITE DE ACEITAÇÃO DE 10PPM DO PRODUTO CONTAMINANTE NO PRODUTO SUBSEQUENTE

TABELA 2.12 - Dados necessários para cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza

Tipo de dado / Informação	Dado / Informação
Agente de limpeza=Solução de P3-Cosa PUR 80 1%	P3-Cosa PUR 80
Indicador (X)	Detergente
LD ₅₀ (mg/kg) ⁽¹⁾	1250 ⁽²⁾ (dado obtido no fornecedor do agente de limpeza)
NOEL (mg/kg)= Dose sem efeito observável	0,0063 (valor calculado)
BW (kg)= Peso corporal médio (<i>medium body weight</i>)	70
ADI (mg)= ingestão diária aceitável (<i>acceptable daily intake</i>)	0,4375 (valor calculado)
MaxTD _{SUBS} = Dose Terapêutica Máxima Diária do lote subsequente (kg)	0,003
SSA = área superficial amostrada (<i>swab</i>) (cm ²)	Estrelas 25 Anel de ligação da tremonha ao distribuidor 25 Raspadores do distribuidor 25 Prato 25 Cavidades das matrizes 25
ESA = Área superficial do Equipamento (cm ²)	3000
MBS _{SUBS} = Tamanho mínimo do lote do subsequente (Kg)	4

⁽¹⁾LD₅₀ - dose ou concentração em que 50% dos organismos submetidos ao teste morrem

⁽²⁾Ligeiramente tóxico (classificação segundo United States Environmental Protection Agency– EPA)

CÁLCULO DO LIMITE DE ACEITAÇÃO PARA O ESFREGAÇO (SWAB)

TABELA 2.13 - Cálculo do limite de aceitação para o agente de limpeza num processo de *swab*

Nome do Agente de Limpeza	Substância química	LD ₅₀ (mg/kg)	NOEL _x (mg/kg)	ADI
P3 CosaPur 80	-	1250	0,00625	0,4375

MBS _{SUBS} (kg)	MaxTD _{SUBS} (kg)	MAC _x (mg)	10ppm (mg)	SSA (cm ²)	ESA (cm ²)	MAC/ amostra	10ppm/ amostra	Limite de aceitação/ amostra mg/ amostra
4	0,003	583,33	40	25	3000	4,8611	0,3333	0,3333 ¹⁾

¹⁾A preparação de amostra de *swab* será feita para um volume final de 10mL. Factor de conversão para µg/mL=1000

LD₅₀ - dose ou concentração em que 50% dos organismos submetidos ao teste morrem (mg/kg)

NOEL - Dose sem efeito observável (mg/kg)

X – agente de limpeza (detergente)

ADI = ingestão diária aceitável (*acceptable daily intake*)(mg)

MBS_{SUBS} - tamanho mínimo do lote subsequente (kg)

MaxTD_{SUBS} - dose terapêutica máxima diária do lote subsequente (kg)

MAC - *Maximum allowable carryover* (mg)

10 ppm – limite de aceitação de 10ppm (mg)

SSA - área da superfície do equipamento onde se efectuou a amostra (cm²)

ESA - área total da superfície de contacto do equipamento com o produto (cm²)

Após comparação dos resultados obtidos através dos cálculos efectuados para a determinação dos limites de aceitação na Máquina de Comprimir RIVA Piccola, podemos concluir que:

- para a análise do resíduo químico (dexametasona), cuja amostragem é feita por *swab* (por serem áreas de difícil acesso), será seleccionado o CRITÉRIO 1 (Cálculo do limite da contaminação máxima admissível do activo anterior), para se obter o valor do limite da concentração de activo permitida. Esta selecção justifica-se pelo facto do resultado obtido representar uma situação de *worst case* (0,0056 mg/amostra face a 0,3333 mg/amostra);
- para a análise do agente de limpeza (P3-cosa PUR 80), cuja amostragem apenas poderá ser feita por *swab* devido à estrutura do equipamento, será seleccionado o CRITÉRIO 2 (Cálculo do limite de aceitação de 10ppm do produto contaminante no produto subsequente), para se obter o valor do limite da concentração de agente de limpeza permitida. Esta selecção justifica-se pelo facto de obtermos uma situação de *worst case* (0,3333 mg/amostra face a 4,8611 mg/amostra).

No entanto, e de acordo com a temática deste trabalho prático, que tem como principal foco a determinação de resíduos de princípio activo (dexametasona), não

vamos desenvolver, nem validar o método analítico para a determinação de resíduos de agente de limpeza com amostragem por *swab*, uma vez que esta seguiria a lógica do método validado para o activo.

CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO: Todos os *swabs* de análise de substância activa devem cumprir com os limites de contaminação pré-estabelecidos (0,0056 mg/amostra).

TABELA 2.14 - Resumo dos limites de aceitação

Procedimento	Análise visual e olfactiva
Método Amostragem	Inspeção visual e olfactiva
Critério de Aceitação	O equipamento deve apresentar-se visualmente limpo, seco e sem odores detectáveis.

Procedimento	Análise de resíduos químicos
Método Amostragem	Esfregaço (<i>swab</i>)
Material	Aço Inox AISI 316
Indicador	Dexametasona
Critério de Aceitação	0,0056 mg/amostra (concentração= 0,56 µg/mL; volume final de amostra 10ml)

2.2 Desenvolvimento do método de validação de limpeza

2.2.1 Materiais e Equipamentos

- **REAGENTES**

- Etanol p.a., Fisher Scientific
- Acetonitrilo HPLC, Panreac
- Água Ultra-purificada, Enkrott Purelab Ultra system
- P3-Cosa PUR 80 (agente de limpeza)

- **MATÉRIAS-PRIMAS**

Substância de referência	Lote	Pureza (%)	Prazo Validade	Origem
Padrão Primário Dexametasona	K0H243	99,7	-	USP
Dexametasona	1100003-01	100,06(a)	06-06-2012	LEF
Dexametasona	1100003-01	98,54(a)	30-09-2013	LEF

(a) Teor "as is", aferição realizada no LEF contra padrão primário

Placebo	Lote	Origem
Croscarmellose	3201083167	JRS Pharma
Prosolv	41314G01	JRS Pharma

- **PRODUTO ACABADO (COMPRIMIDOS)**

A composição de comprimidos Dexametasona 1, 2, 4 e 8 mg é a seguinte:

Componente	mg/comp	mg/comp	mg/comp	mg/comp
Dexametasona	1,0	2,0	4,0	8,0
Prosolv	95,0	94,0	92,0	88,0
Croscarmellose	4,0	4,0	4,0	4,0
Total placebo	99,0	98,0	96,0	92,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0

- **PLACEBO EQUIVALENTE A COMPRIMIDO 8mg**

A preparação de placebo será equivalente à dosagem de 8mg, uma vez que a quantidade usada nesta situação corresponde a um *worst case*.

Componente	mg/comp
Prosolv	88,0
Croscarmellose	4,0
Total placebo	92,0

- **MATERIAIS**

- Large Alpha Swab (TX714A) (ITW Texwipe)
- Placa aço inox 316 e placa silicone

Uma amostra de material do Misturador em V e da Máquina de Comprimir Riva Piccola, assim como uma amostra da tampa de silicone do Misturador em V, foram obtidas, tendo este material a mesma constituição que em ambos os equipamentos: aço inox e silicone (Figura 2.6).

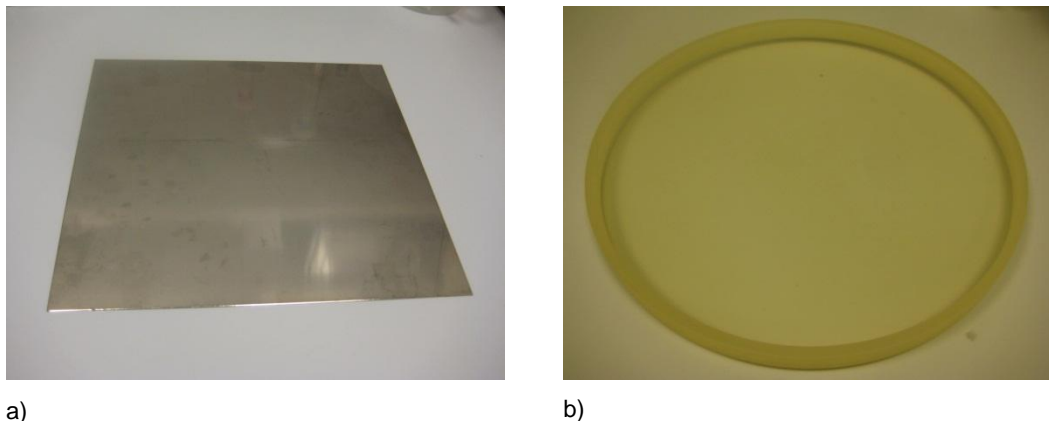


FIGURA 2. 6 - Amostra de a) aço inox e b) tampa de silicone

- **EQUIPAMENTO**

Sistema cromatográfico 1

Bomba: VWR Hitachi Elite LaChrom L-2130

Injector: VWR Hitachi Elite LaChrom L-2200

Detector: Diode Array VWR Hitachi Elite LaChrom L-2455

Organizer: VWR Hitachi Elite LaChrom

Forno: Elite LaChrom L-2300

Coluna: Inertsil ODS-3 (C18), 250 x 4 mm, 5 µm

Sistema cromatográfico 2

Bomba: VWR Hitachi Elite LaChrom L-2130

Injector: VWR Hitachi Elite LaChrom L-2200

Detector: Diode Array VWR Hitachi Elite LaChrom L-2455

Organizer: Merck Hitachi Elite LaChrom

Coluna: Inertsil ODS-3 (C18), 250 x 4 mm, 5 µm

- **OUTROS EQUIPAMENTOS**

- Balança analítica (Sartorius R200D) e registrador (Sartorius YDP03 OCE)
- Balança (Mettler PJ3000)
- Balança analítica (Mettler Toledo AB204-S) e registrador (Mettler Toledo RS-P42)
- Banho Ultrassônico (VWR USC1200TH)
- Banho Ultrasônico (Sonorex RK510S)
- Micropipeta VWR 10 µl – 100 µl
- Centrifuga eppendorf 5702R

2.2.2 Método analítico e Protocolo de soluções

Nesta secção encontra-se a descrição do método utilizado no decorrer do trabalho para a quantificação de resíduos de dexametasona por HPLC.

A metodologia utilizada para avaliar a recuperação de resíduos de dexametasona foi desenvolvida e validada com base na monografia *Dexamethasone* (Monografias USP e EP, 2010).

- **Fluxo:** 1,0 mL/min
- **Detecção:** UV a 254 nm
- **Volume de injeção:** 25 µl
- **Temperatura da coluna:** Temperatura ambiente (controlada)
- **Temperatura amostra:** Temperatura ambiente (18°C)
- **Tempo de corrida:** 10 minutos
- **Fase Móvel:** Acetonitrilo: H₂O (45:55 v/v)
- **Solvente:** Etanol

2.2.2.1 Selectividade

1. Solvente de extracção

Etanol (para limpeza da superfície do equipamento)

2. Branco do swab + placa aço inox ou placa silicone

Placa Inox e Placa silicone – Limpar a placa com dois e um swabs, respectivamente, simulando um ensaio (proceder de acordo com o ponto 2.2.2.5 (*Extracção / Recuperação*)).

3. Solução de detergentes a 33 µg/mL (P3 Cosa Pur 80)

Substância	Solução Stock			Solução Trabalho		
	Quantidade (mg)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)
Detergente	33,0	100	330,0	1	10	33,0

(a) Solvente: H₂O

4. Solução Placebo (equivalente a uma amostra a 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL)

- **Solução de placebo equivalente a 0,56 µg/mL**

Substância	Solução Stock			Solução Intermédia			Solução Trabalho		
	Quantidade (mg)	V (mL)(a)(c)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (b)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (b)	C (µg/mL)
Placebo 8 mg (Prosolv+ Croscarmellose)	140,0	100	---	1	10	---	4	10	---

(a) H₂O

(b) Solvente: etanol

(c) Centrifugar 10min. A 4400rpm

- Solução de placebo equivalente a 0,65 µg/mL

Substância	Solução Stock			Solução Intermédia			Solução Trabalho		
	Quantidade (mg)	V (mL)(a)(c)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (b)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (b)	C (µg/mL)
Placebo	162,5	100	---	1	10	---	4	10	---

(a) H₂O

(b) Solvente: etanol

(c) Centrifugar 10 min. A 4400 rpm

5. Solução de Referência a 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL

- Solução de referência a 0,56 µg/mL

Substância	Solução Stock			Solução Intermédia			Solução Trabalho		
	Quantidade (mg)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)
Dexametasona	14,0	100	140,0	1	100	1,4	4	10	0,56

(a) Solvente: etanol

- Solução de referência a 0,65 µg/mL

Substância	Solução Stock			Solução Intermédia			Solução Trabalho		
	Quantidade (mg)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)
Dexametasona	13,0	100	130,0	1	100	1,3	5	10	0,65

(a) Solvente: etanol

6. Solução LOQ

Substância	Solução Stock			Solução Intermédia			Solução Trabalho		
	Quantidade (mg)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)
Dexametasona (0,56 µg/mL)	14,0	100	140,0	1	100	1,4	1	20	0,07
Dexametasona (0,65 µg/mL)	16,25	100	162,5	1	100	1,6	1	20	0,08

(a) Solvente: etanol

7. Solução Amostra de Limpeza

Proceder de acordo com o descrito no ponto 2.2.2.5 (*Extracção / Recuperação*).

Ensaio: Injectar em duplicado todas as soluções.

2.2.2.2 Linearidade (0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL)

- Solução Stock (SS) – 0,56 µg/mL

Substância	Solução Stock (SS)			Solução Intermédia (SI)		
	Quantidade (mg)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)
Dexametasona (0,56 µg/mL)	14,0	100	140,0	1	100	1,4

(a) Solvente: etanol

Soluções de trabalho

Solução Inicial	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Nível (%)	Identificação da Solução
SI	1	20	0,07	12,5	S1
SI	1	10	0,14	25,0	S2
SI	1,5	10	0,21	37,5	S3
SI	2	10	0,28	50,0	S4
SI	2,5	10	0,35	62,5	S5
SI	3	10	0,42	75,0	S6
SI	4	10	0,56	100,0	S7
SI	5	10	0,70	125,0	S8
SI	6	10	0,84	150,0	S9

(a) Solvente: etanol

- Solução Stock (SS) – 0,65 µg/mL

Substância	Solução Stock (SS)			Solução Intermédia (SI)		
	Quantidade (mg)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)
Dexametasona (0,65 µg/mL)	16,25	100	162,5	1	100	1,6

(a) Solvente: etanol

Soluções de trabalho

Solução Inicial	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Nível (%)	Identificação da Solução
SI	1	20	0,08	12,5	S1
SI	1	10	0,16	25,0	S2
SI	1,5	10	0,24	37,5	S3
SI	2	10	0,33	50,0	S4
SI	2,5	10	0,41	62,5	S5
SI	3	10	0,49	75,0	S6
SI	4	10	0,65	100,0	S7
SI	5	10	0,81	125,0	S8
SI	6	10	0,98	150,0	S9

(a) Solvente: etanol

Ensaio: Injectar cada uma das soluções em duplicado.

2.2.2.3 Limite de Quantificação

Preparação descrita no ponto 2.2.2.1 (*Selectividade*).

Ensaio: Após a definição do limite de quantificação, injectar seis vezes a solução padrão correspondente.

2.2.2.4 Limite de Detecção

- Solução LOD

Substância	Solução Stock (SS)			Solução Intermédia (SI)		
	Quantidade (mg)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)
Dexametasona (0,56 µg/mL)	14,0	100	140,0	1	100	1,4

(a) Solvente: etanol

Solução Inicial	Aliquota (mL)	V (mL) (a)	C (µg/mL)	Nível (%)
SI	1	50	0,03	5,0

(a) Solvente: etanol

Ensaio: Após a definição do limite de detecção, injectar duas vezes a solução padrão.

2.2.2.5 Extracção / Recuperação

1) PLACA INOX (0,56 µg/mL)

- Soluções Amostra

Soluções de sobrecarga								
Substância	Quantidade (mg)	V (mL)(a)	C (µg/mL)	Sol. Sobr.	Aliquota (mL)	V (mL)	C (µg/mL)	Sol. Sobr.
Dexametasona	14,0	100	140,0	S1	1	20	7,0	S2
					4	10	56,0	S3
					6	10	84,0	S4

(a) Solvente: etanol

Placa sobrecarregada				
Nível	Sol. Sobr.	Aliquota (µl) (a)	Volume (mL) (b)	C (µg/mL)
LOQ	S2	100	10	0,07
Intermédio (100%)	S3	100	10	0,56
Alto (150%)	S4	100	10	0,84

(a) Aplicação com uma micropipeta calibrada.

(b) Após a solução secar, proceder de acordo com o descrito no procedimento de amostragem

Procedimento de amostragem

Após a secagem, cada uma das placas (inox e silicone) deve ser amostrada de acordo com os passos abaixo descritos:

- Humedecer o *swab* no solvente de extracção (etanol) (usar 2 swabs molhados em etanol na placa inox e 1 swab molhado na placa silicone);
- Pressionar o *swab* contra a parede do tubo para retirar o excesso;
- Passar o *swab* na superfície da placa contaminada, uniformemente com um dos lados na direcção horizontal e com o outro lado na direcção vertical para cobrir toda a área (5 cm x 5 cm) (Figura 2.7).

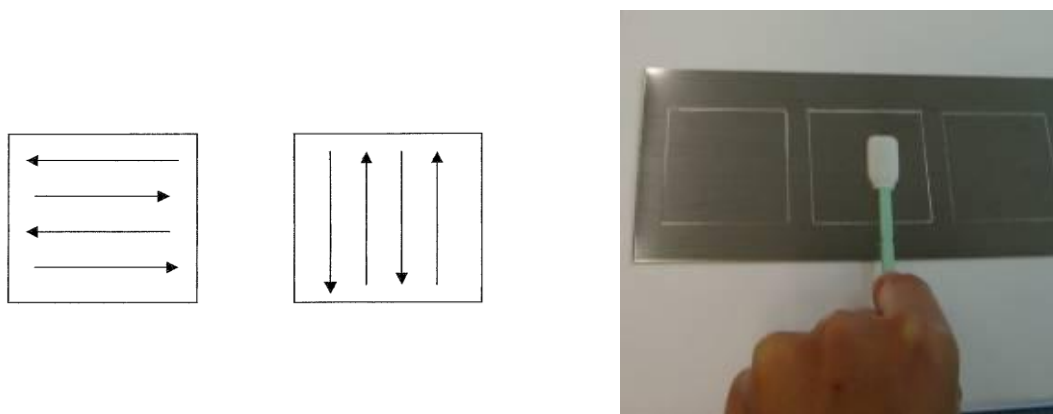


FIGURA 2.7 - Esquema de amostragem com *swab*

- Cortar o cabo do *swab* e colocá-lo num frasco com tampa;
- Adicionar 10 mL de solvente de extracção (etanol);
- Extrair o contaminante do *swab*, introduzindo o frasco no ultrassons durante 5 minutos.

• Solução Referência

Proceder de acordo com o ponto 2.2.2.1 (*Selectividade*).

Ensaio: Injectar duas vezes cada solução.

2) PLACA INOX E SILICONE (0,65 µg/mL)

- Soluções Amostra

Soluções de sobrecarga								
Substância	Quantidade (mg)	V (mL)	C (µg/mL)	Sol. Sobr.	Aliquota (mL)	V (mL)	C (µg/mL)	Sol. Sobr.
Dexametasona	13,0	100	130,0	S1	1	20	6,5	S2
					6	10	65,0	S3
	9,8		98,0	S4				

(a) Solvente: etanol

Placa sobrecarregada				
Nível	Sol. Sobr.	Aliquota (µl) (a)	Volume (mL) (b)	C (µg/mL)
LOQ	S2	100	10	0,08
Intermédio (100%)	S3	100	10	0,65
Alto (150%)	S4	100	10	0,98

(a) Aplicação com uma micropipeta calibrada.

(b) Após a solução secar, proceder de acordo com o descrito no procedimento para amostragem

- Solução Referência

Proceder de acordo com o ponto 2.2.2.1 (*Selectividade*).

Ensaio: Injectar duas vezes cada solução.

2.2.2.6 Precisão

a) Repetibilidade de Sistema

A solução referência de analito ao nível de concentração intermédia (100%), foi preparada como descrito no ponto 2.2.2.1 (*Selectividade*) e injectada seis vezes.

b) Repetibilidade de análise

- Soluções Amostra

Seis replicados da solução amostra de limpeza foram preparados ao nível de concentração intermédia (100%) (placa inox: 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL; silicone: 0,65 µg/mL), como descrito no ponto 2.2.2.5 (*Extração / Recuperação*).

- Solução de referência

A solução referência de analito ao nível de concentração intermédia, foi preparada como descrito no ponto 2.2.2.1 (*Selectividade*).

c) Precisão intermédia

Dois analistas diferentes, em dias diferentes, prepararam 6 replicados da solução amostra de limpeza (em ambas as placas de inox e silicone) ao nível de concentração intermédio (100%) (placa inox: 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL; silicone: 0,65 µg/mL), assim como a solução de referência, descritas no ponto 2.2.2.1 (*Selectividade*).

2.2.2.7 Estabilidade

- Estabilidade em placas

Foram preparados dois replicados de cada uma das placas, sobrecarregando-as com a substância activa ao nível de concentração intermédia (100%) (placa inox: 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL; silicone: 0,65 µg/mL), como descrito no ponto 2.2.2.5 (*Extracção / Recuperação*). As placas foram guardadas à temperatura ambiente (20-24°C), e protegidas da luz. Ambas as placas foram mantidas durante 72h. Após este período de tempo, procedeu-se à limpeza das placas, de acordo com o descrito no 2.2.2.5 (*Extracção / Recuperação*).

Solução de referência

A solução referência de analíto ao nível de concentração intermédia, foi preparada como descrito no ponto 2.2.2.1 (*Selectividade*).

- Estabilidade de soluções

Foram preparadas soluções amostra de limpeza, sobrecarregando as placas com a substância activa ao nível de concentração intermédia (placa inox: 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL; sílica: 0,65 µg/mL), de acordo com o descrito no ponto 2.2.2.5 (*Extracção / Recuperação*).

Cada uma destas soluções foi dividida em três alíquotas, guardando uma a temperatura ambiente (20 – 24°C) na bancada de trabalho, não protegida da luz, outra a 5°C protegida da luz, durante 3 dias e outra no injectador do HPLC (18°C).

Solução de referência

A solução referência de analíto ao nível de concentração intermédia, foi preparada como descrito no ponto 2.2.2.1, a cada tempo de análise (*Selectividade*).

Ensaio: Injectar duas vezes cada solução.

2.2.2.8 System Suitability

A solução referência de analíto ao nível de concentração intermédia, foi preparada como descrito no ponto 2.2.2.1 (*Selectividade*).

Ensaio: Injectar seis vezes cada solução.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados obtidos no desenvolvimento e validação do Método Analítico

3.1.1 Desenvolvimento do Método Analítico

a) Condições cromatográficas

Foram inicialmente efectuadas pesquisas bibliográficas, no sentido de recolher informação relativamente a métodos já desenvolvidos para quantificar resíduos de dexametasona, contudo a informação encontrada foi quase inexistente. Numa pesquisa seguinte, foram consultados os métodos de quantificação de dexametasona matéria-prima e comprimidos, descritos nas Farmacopeias Americana (USP) e Europeia (EP), concluindo-se numa primeira abordagem, que as condições analíticas utilizadas apresentavam pouco em comum. O método descrito pela EP utiliza o espectrofotómetro como instrumento de quantificação, contudo devido à pouca sensibilidade dos resultados obtidos por este método, este foi automaticamente excluído, uma vez que a quantificação de resíduos necessita de grande sensibilidade a baixas concentrações (*EP Monographs: Dexamethasone*, 04/2010:0388).

Relativamente ao método descrito na USP para matéria-prima e comprimidos de dexametasona, para além de utilizar um método por cromatografia (HPLC), o que seria uma vantagem, apresentava também como principal diferença a composição de fase móvel e de solvente (*USP Monographs: Dexamethasone e Dexamethasone Tablets*, 127.0.0.1:33281).

Optou-se por iniciar o desenvolvimento de método cromatográfico tendo por base a monografia da USP em vigor, *Dexamethasone Tablets*, definindo-se inicialmente, as seguintes condições analíticas:

Coluna: Inertsil ODS-3 (C-18), 250 x 4,6 mm, 5 µm

Fase móvel: H₂O / Acetonitrilo (25:75)

Fluxo: 1,0 mL/min.

λ: 254 nm

Volume de injeção: 25 µl

Solvente: H₂O/MeOH (2:1)

Ao analisarmos os resultados obtidos com a fase móvel proposta pela pesquisa inicial (monografia USP), verificou-se que o pico de activo se apresentava com um tempo de retenção de 3 minutos. Partindo da fase móvel testada inicialmente, foram feitas algumas modificações nos parâmetros que permitissem aumentar o tempo de retenção do activo.

Para a verificação da importância de pequenas variações de fluxo e proporções de fase móvel, foram definidas as seguintes condições experimentais:

- 1) **Fase móvel:** H₂O / Acetonitrilo (40:60) e **Fluxo:** 1,2 mL/min;
- 2) **Fase móvel:** H₂O / Acetonitrilo (40:60) e **Fluxo:** 1,0 mL/min;
- 3) **Fase móvel:** H₂O / Acetonitrilo (50:50) e **Fluxo:** 1,0 mL/min;
- 4) **Fase móvel:** H₂O / Acetonitrilo (55:45) e **Fluxo:** 1,0 mL/min;

O aumento do componente aquoso na composição da fase móvel mostrou-se essencial para a obtenção de um pico com maior resolução cromatográfica. Porém o acréscimo de fluxo mostrou-se significativamente elevado, resultando numa menor retenção da dexametasona na coluna cromatográfica, diminuindo ainda mais o seu tempo da retenção. O tempo de retenção do activo encontrado com a última experiência efectuada, foi de aproximadamente 7 minutos e não foram observados picos interferentes na região de interesse.

Determinou-se assim, que o método que se mostrava mais eficiente para a análise de resíduos de dexametasona, seria constituído pelos seguintes parâmetros:

- fase móvel: H₂O / Acetonitrilo (55:45)
- fluxo : 1,0 mL/min.

No processo de desenvolvimento do procedimento analítico, os factores considerados potencialmente críticos foram: fluxo, componentes de fase móvel, solvente e operador. O intuito de verificar cada um destes factores foi o de comprovar se pequenas alterações do procedimento poderiam afectar ou não o desempenho do método.

No que diz respeito ao operador, a variação deste factor foi introduzida durante a execução do ensaio de precisão, de forma intercalada (operador A e operador B). A avaliação das diferenças dos resultados obtidos, apresentada mais à frente, comprovou que não há qualquer influência do operador que executa a análise.

b) Solvente e solvente de extracção

O desenvolvimento de métodos para a análise de fármacos, tradicionalmente inclui etapas de tratamento preliminar da amostra, como, por exemplo, agitação, ultrassons e centrifugação. Em muitos casos tais procedimentos são os responsáveis por grande parte do tempo despendido num método analítico e, além disso, o grande manuseio e possíveis decomposições das amostras podem ocasionar baixos níveis de recuperação dos analitos que se encontram em baixas concentrações. De modo geral, a preparação de amostras deve ter um procedimento rápido, com poucas etapas, capaz de produzir recuperações quantitativas e reprodutivas do analito (GIL *et al.*, 2007). Por estes motivos, uma primeira etapa do desenvolvimento deverá recair na escolha do melhor solvente, pois uma escolha acertada irá minimizar todos os passos seguintes de dissolução da amostra.

Como referido anteriormente, o solvente descrito em ambas as monografias (EP e USP), para a preparação de amostras, apresentavam diferenças:

- EP (monografia *Dexamethasone*): solvente: Etanol
- USP (monografia *Dexamethasone*): solvente: Metanol
- USP (monografia *Dexamethasone Tablets*): solvente: H₂O/MeOH (2:1)

Tendo em conta o trabalho em questão e de acordo com a bibliografia encontrada relativamente a solventes de extracção para amostras de limpeza com amostragem por *swab*,

optou-se pelo solvente etanol. Segundo a bibliografia, recomenda-se que os solventes utilizados para humedecer o *swab* sejam de grau analítico, de adequada estabilidade e solubilidade para as substâncias activas a serem amostradas e com rápido tempo de evaporação. Por este motivo decidiu-se que o etanol seria usado como solvente de preparação e extracção.

c) Estudo de recuperação para a amostragem

O método analítico foi desafiado em combinação com o método de amostragem utilizado, a fim de demonstrar que os contaminantes podem ser recuperados da superfície do equipamento e demonstrar o “nível” de recuperação e a sua “consistência”. Por “nível” entende-se a percentagem do resíduo que pode ser recuperada no meio em que está aderido, e por “consistência”, a dispersão dos valores encontrados para amostragens repetidas feitas sob a mesma condição.

Os estudos foram realizados por amostragem directa (*swab*) para avaliação da recuperação de produto. A determinação foi realizada em duplicado, sendo apenas considerada a técnica de amostragem adequada quando o produto obtivesse quantidade superior a 60% ou 70% da quantidade teórica. Resultados negativos poderiam ser indicadores de uma metodologia de amostragem inadequada.

No presente estudo, foram efectuados vários testes no sentido de se obterem os melhores resultados de recuperação. Experiências quanto ao número e condições de *swabs* utilizados, volume e instrumentos de aplicação de contaminante na placa e a experiência de diferentes operadores, foram alguns dos pontos críticos a ter em conta. A percentagem de recuperação do resíduo de produto foi determinada utilizando um processo de amostragem que mimetiza exactamente o procedimento utilizado na prática (mesmo *swab*, placa com o mesmo tipo de material do equipamento, mesma área). Neste caso quadrantes com 25cm² foram utilizados para contaminação de quantidade conhecida de dexametasona.

Inicialmente foi preparada uma solução de dexametasona, de modo a que 200µL dessa solução depois de adicionados à placa com área de 25cm², contivessem a quantidade calculada no critério de aceitação mais rigoroso para resíduo de produto (TABELA 3.1).

Os diferentes testes efectuados e os resultados obtidos, estão detalhados na tabela abaixo.

TABELA 3.1 – Resultados obtidos em estudos de recuperação de 0,56 µg/mL de substância activa em placa aço inox

Placa aço inox			Recuperação (%)	Observações
	Volume pipetado	Conc. (µg/mL)	Individual	
1 swab	200 µL	0,28	44,19	As soluções preparadas para efectuar este teste, não foram correctamente preparadas em termos de concentração final, contudo os resultados foram reportados no sentido de se avaliar as diferenças entre condições.
2 swabs (1 molhado; 1 seco)	200 µL	0,28	48,02	
2 swabs (molhados)	200 µL	0,28	57,42	
1 swab	200 µL (com pipeta de vidro graduada)	0,56	65,27	Aplicação de volume de contaminante alastra-se descontroladamente e sai dos limites
1 swab	200 µL (micropipeta)	0,56	72,87	Aplicação do volume de solução é mais controlada, mas com algumas dificuldades.
1 swab	200 µL (operador diferente)	0,56	84,17	Aplicação de volume de solução é controlada com algum cuidado, não havendo perdas.
1 swab	100 µL (micropipeta)	0,56	79,96	Aplicação de volume de solução é muito bem controlada
2 swabs (molhados)	100 µL (micropipeta)	0,56	88,69	Aplicação de volume de solução é muito bem controlada

Cada superfície de 25 cm² foi contaminada com 200 µL da solução. Após a sua secagem, procedeu-se à limpeza da mesma com um *swab*, e analisaram-se as soluções preparadas. Contudo o volume de 200 µL durante a sua aplicação, mostrou-se demasiado elevado, havendo grande dificuldade em manter toda a solução na área pretendida sem a ocorrência de perdas. Esta situação reflectiu-se nos resultados obtidos (Tabela 3.1). Deste modo, experimentou-se a adição do contaminante com um volume mais reduzido, 100 µL, o que facilitou a secagem e eliminou a possibilidade de possíveis perdas.

A amostragem foi realizada utilizando 1 e 2 *swabs* por superfície, contudo o uso de 2 *swabs* mostrou-se mais eficiente, com a obtenção de resultados bastante satisfatórios. Ambos os *swabs* foram embebidos em etanol, antes de realizar a amostragem na placa. Esta amostragem foi realizada de acordo com os movimentos da figura 2.7. Os dois *swabs* foram inseridos no mesmo frasco que continha 10mL de etanol. A homogeneização da solução contida no frasco com os *swabs* foi realizada através de colocação no ultrassons durante 5 minutos. A determinação foi efectuada por HPLC.

Os resultados obtidos apresentaram uma significativa discrepância para os valores de recuperação. Contudo, foi possível verificar que a aplicação de um volume mais reduzido na placa e a posterior limpeza da mesma com dois *swabs* molhados permitiu atingir valores de recuperação acima de 70,0%, que é o desejável. Este estudo confirmou as características anteriormente referidas da dexametasona, as quais a permitiram escolher como um *worst case*.

Semelhante estudo foi efectuado para o material de silicone, o qual permitiu concluir que a aplicação de 100 µL de solução contendo dexametasona e a posterior amostragem com 1 *swab* molhado, seria o suficiente para a obtenção de bons resultados de recuperação (TABELA 3.2).

TABELA 3.2 – Resultados obtidos em estudos de recuperação de 0,65 µg/mL de substância activa em placa silicone

Silicone			Recuperação (%)
	Volume pipetado	Conc. (µg/mL)	Individual
1 <i>swab</i>	100 µL	0,65	59,40
2 <i>swabs</i> (1molhado;1seco)	100 µL	0,65	61,74

Após avaliação dos resultados obtidos, verificamos que a recuperação obtida para ambas as condições de amostragem é semelhante, apresentando valores próximos de 60% de recuperação. Decidiu-se optar pela amostragem com apenas 1 *swab* (apesar do resultado não cumprir a especificação, 70%), pelo facto de ser um teste inicial e apenas elucidativo do perfil de recuperação.

3.1.2 Validação do Método Analítico

Nos pontos seguintes estão apresentados, para cada parâmetro de validação, os resultados obtidos, assim como, a interpretação dos mesmos relativamente aos critérios que guiaram este trabalho (Tabela 1.10).

3.1.2.1 Selectividade

A Selectividade foi avaliada através da injeção de soluções de:

- Solvente usado na extracção dos *swabs* (etanol)
- Branco do *swab* + etanol
- Branco do *swab* + placa aço inox / silicone, simulando um ensaio
- Solução de detergente P3 Cosa Pur 80 a 33,3 µg/mL (*worst case*)

- Solução de placebo a concentração equivalente a uma amostra a 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL
- Solução de referência: Solução da substância activa a uma concentração correspondente ao nível intermediário (0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL)
- Solução da substância activa à concentração do LOQ
- Solução amostra submetida a processo de limpeza à concentração de 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL, em placa aço inox e de 0,56 µg/mL, em silicone (Amostra Exactidão)

TABELA 3.3 – Selectividade

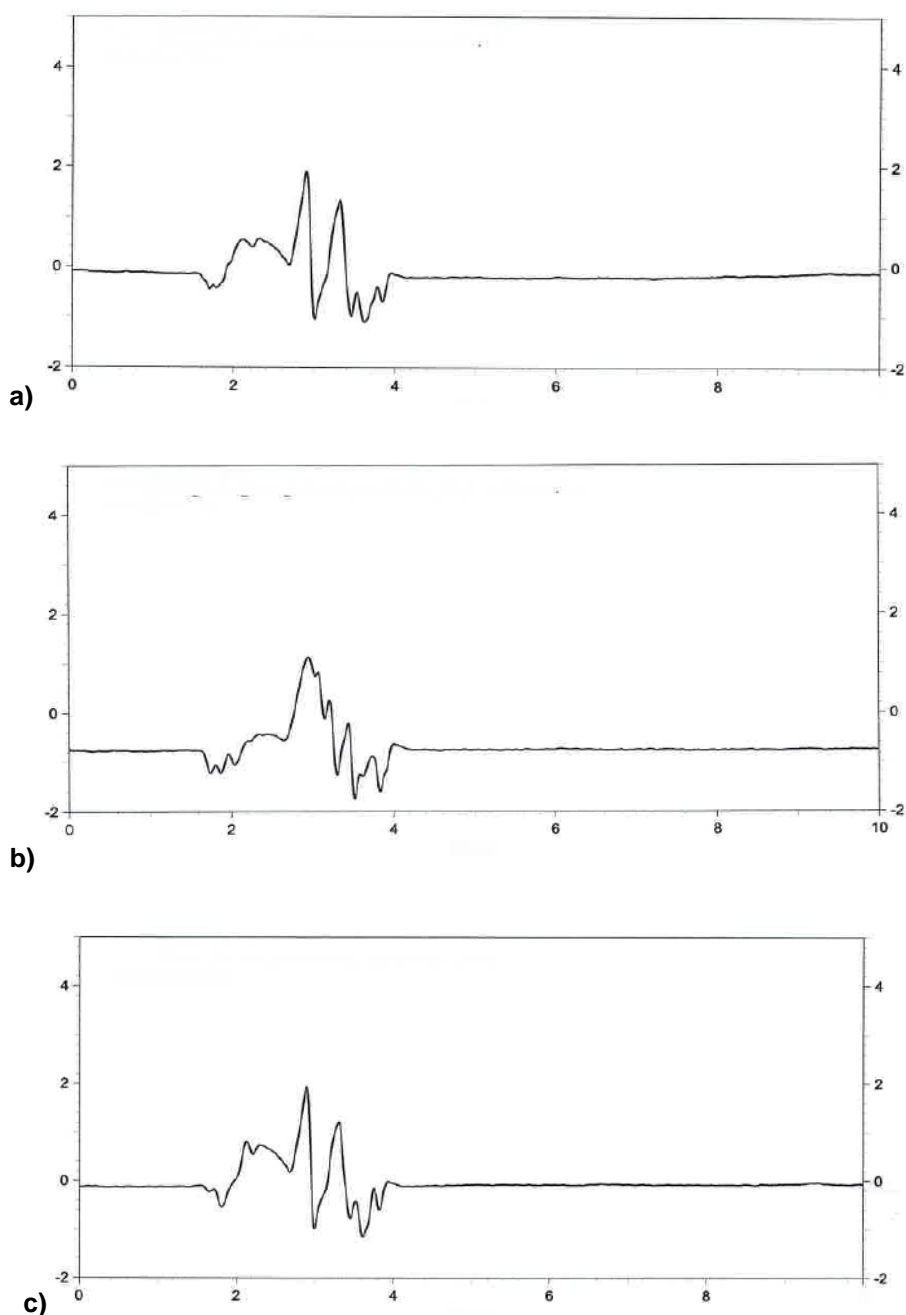
Solução	Identificação	t _R (min.)	RRt	Área
Solvente Etanol	---	≤ 4.2	---	---
Solvente + Swab	Solvente	≤ 4.2	---	---
Solvente + Swab + Placa inox	Solvente	≤ 4.2	---	---
Solvente + Swab + Silicone	Solvente	≤ 4.2	---	---
Placebo de Comprimidos de Dexametasona a 0,56 µg/mL	Solvente	≤ 4.2	---	---
Placebo de Comprimidos de Dexametasona a 0,65 µg/mL	Solvente	≤ 4.2	---	---
Detergente Cosa Pur 80 a 33 µg/mL	Solvente	≤ 4.2	---	---
Padrão Dexametasona a 0,56 µg/mL (concentração de trabalho)	Solvente Dexametasona	≤ 4.2 6.8	--- ---	--- 91658
Padrão Dexametasona a 0,65 µg/mL (concentração de trabalho)	Solvente Dexametasona	≤ 4.2 6.6	--- ---	--- 100045
Dexametasona à concentração LOQ (0,07 µg/mL)	Solvente Dexametasona	≤ 4.2 6.8	--- ---	--- 6720
Dexametasona à concentração LOQ (0,08 µg/mL)	Solvente Dexametasona	≤ 4.2 6.6	--- ---	--- 9906
Amostra recolhida de Placa aço inox a 100% (0,56 µg/mL)	Solvente Dexametasona	≤ 4.2 6.8	--- ---	--- 69144
Amostra recolhida de Placa aço inox a 100% (0,65 µg/mL)	Solvente Dexametasona	≤ 4.2 6.6	--- ---	--- 91670
Amostra recolhida de Placa silicone a 100% (0,65 µg/mL)	Solvente Dexametasona	≤ 4.2 6.6	--- ---	--- 92443

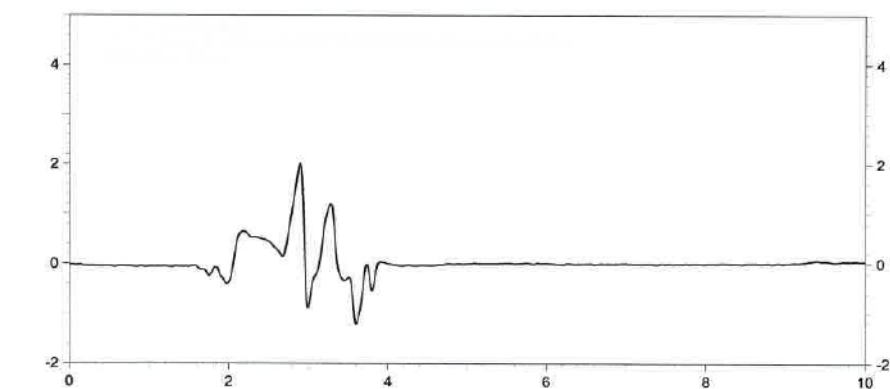
Rt – Tempo de Retenção; RRt – Tempo de Retenção Relativo em relação ao pico de Dexametasona

Após a análise dos cromatogramas, verifica-se que a inexistência de interferentes foi evidente em todas as amostras (solução de placebo, solvente, detergente, *swab* e *swab* +placas simulando um ensaio). Este facto é evidente pela observação comparativa entre os cromatogramas das várias amostras.

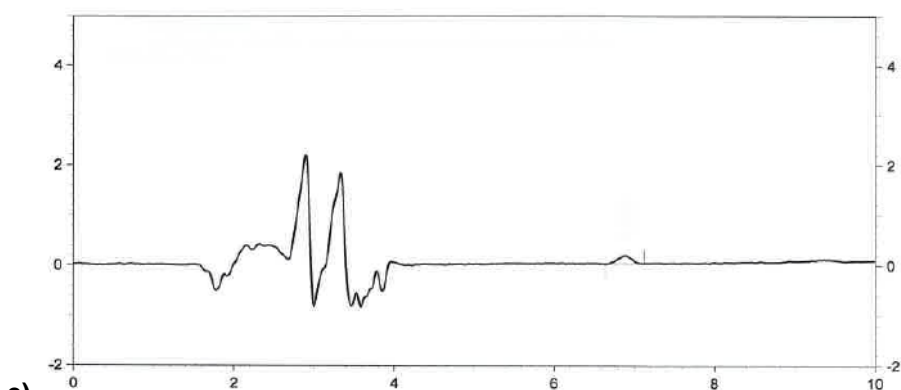
O estudo efectuado permite ainda concluir que os excipientes não interferem na quantificação da substância activa, uma vez que, a solução preparada corresponde à simulação de comprimidos de dexametasona 8mg, isto é, à preparação com maior quantidade de placebo. O perfil apresentado por esta solução é muito semelhante ao do solvente, apresentando apenas alguns picos com tempos de retenção inferiores a 4 minutos.

A figura 3.1 apresenta os cromatogramas que evidenciam esse facto.

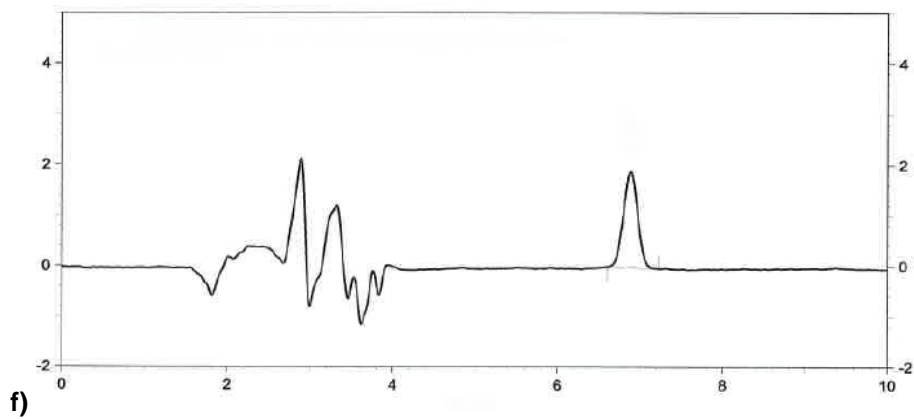




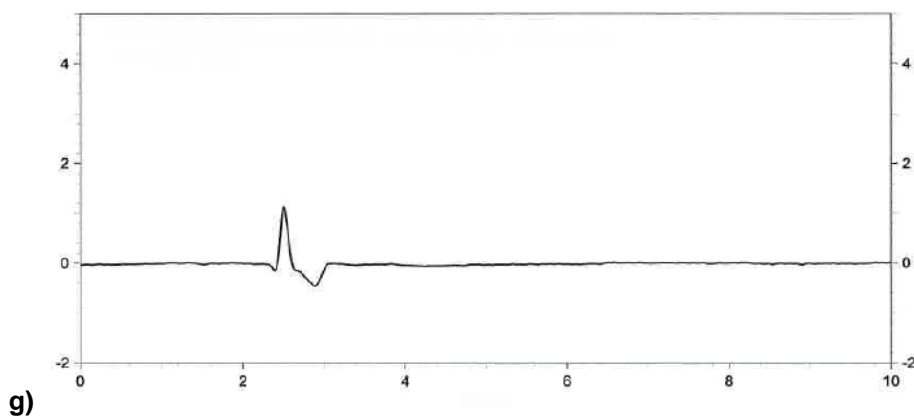
d)



e)



f)



g)

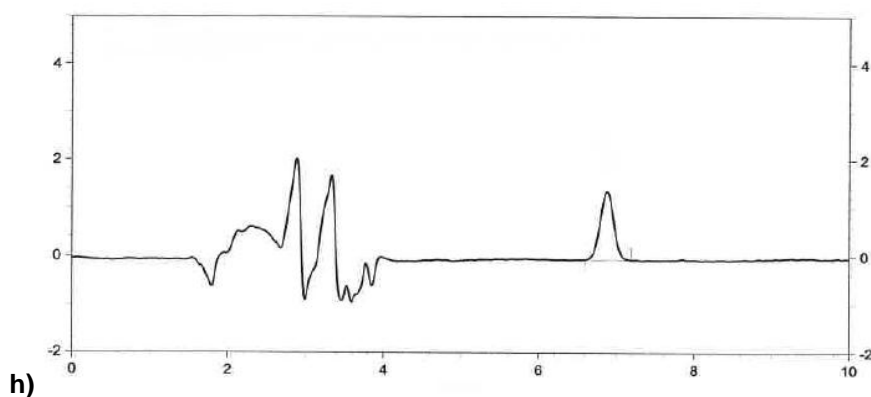


FIGURA 3.1 – Cromatogramas correspondentes ao ensaio de Selectividade: a) Solvente; b) Branco+Etanol+Swab; c) Solução de Placebo (equivalente a 0,56 µg/mL); d) Detergente P3 COSA 80 (33,3 µg/mL); e) Solução LOQ; f) Solução de referência (0,56 µg/mL); g) Amostra Misturador em V; h) Amostra replicado a 100% (volume de injeção de 25 µL)

Os resultados obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos, mostrando que o método analítico é selectivo para a determinação da dexametasona em soluções amostra submetidas a processo de limpeza.

3.1.2.2 Linearidade e gama de trabalho

Para o estudo da linearidade, procedeu-se à construção de uma recta de calibração para a substância activa a quantificar (área *vrs* concentração). Foram preparados oito padrões abrangendo o intervalo de concentração entre 5,0% e 150% de dexametasona. As rectas de calibração construídas estão representadas na FIGURA 3.2 e 3.3, onde está evidenciada a correlação de cada uma delas (TABELA 3.4 e 3.5).

TABELA 3.4 – Parâmetros de Linearidade; Concentração de trabalho 0,56 µg/mL

Parâmetros	Resultados	Critério de Aceitação
Nível	0,07; 0,14; 0,21; 0,28; 0,35; 0,42; 0,56; 0,83 µg/mL (⇔ Gama de trabalho: 5% a 150%)	---
Factor de Resposta		
Média	162141	---
CV (%)	1,88	≤ 10,0
r^2	0,999	≥ 0,99
Regressão linear		
Declive	164977,114	---
Intercepção	- 599,805	---
<u>Intervalo de confiança</u>		
<u>95% para intercepção:</u>		
- limite superior	-1434,518	
-limite inferior	234,907	

CV(%)- coeficiente de variação em %; r^2 - coeficiente de correlação; (Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

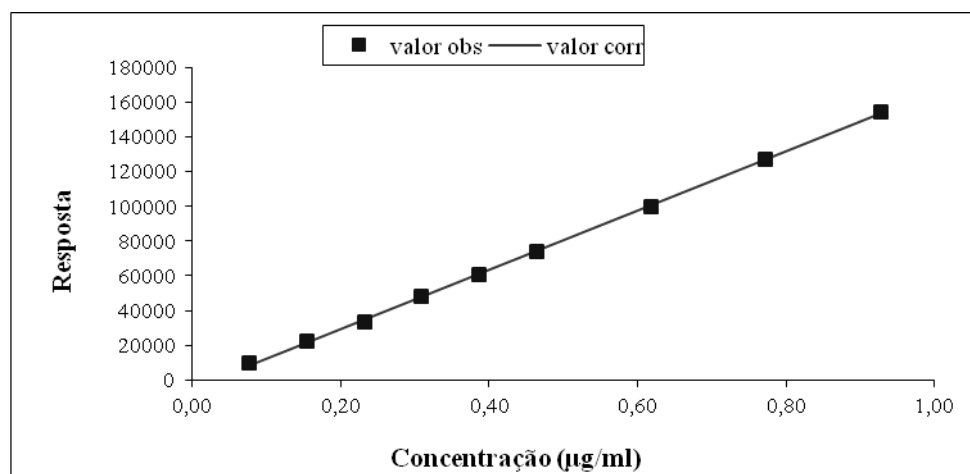


FIGURA 3.2 –Representação gráfica da recta de calibração de dexametasona tendo em conta a concentração de trabalho 0,56 µg/mL e volume de injeção de 25 µL

TABELA 3.5 –Parâmetros de Linearidade; Concentração de trabalho 0,65 µg/mL

Parâmetros	Resultados	Critério de Aceitação
Nível	0,08; 0,16; 0,24; 0,33; 0,41; 0,49; 0,65; 0,81;0,98 µg/mL (⇔ Gama de trabalho: 5% a 150%)	---
Factor de Resposta		
Média	153553	---
CV (%)	3,77	≤ 10,0
r^2	0,999	≥ 0,99
Regressão linear		
Declive	170361,407	---
Intercepção	-4610,047	---
<u>Intervalo de confiança 95% para intercepção:</u>		
- limite superior	-5953,040	
-limite inferior	-3267,054	

CV(%)- coeficiente de variação em %; r^2 - coeficiente de determinação; (Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

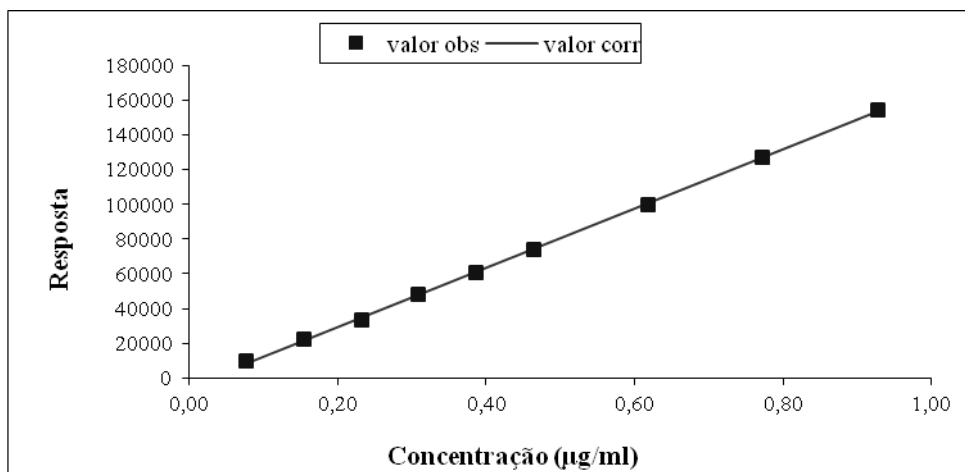
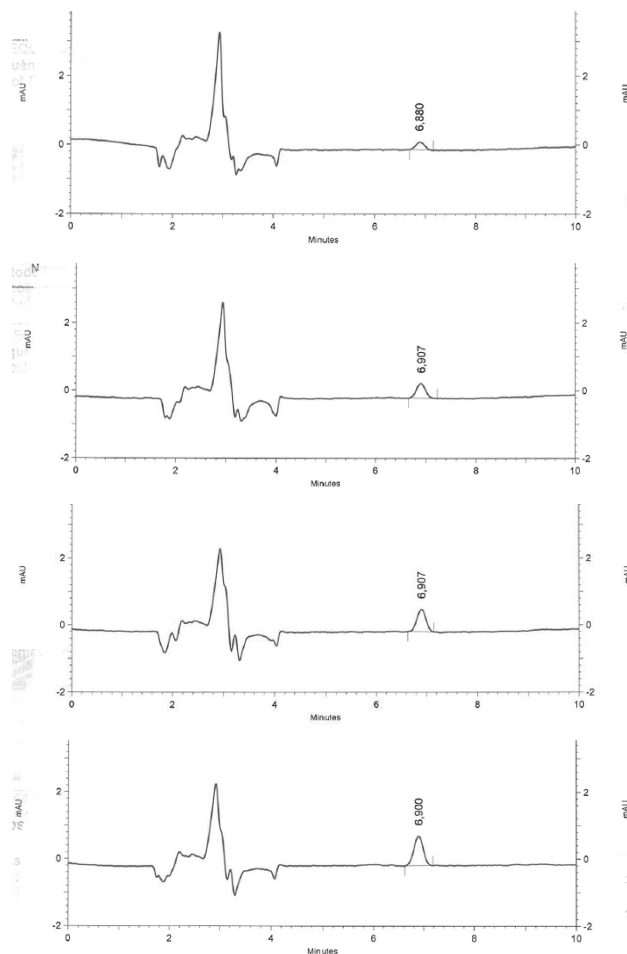


FIGURA 3.3– Representação gráfica da recta de calibração de dexametasona tendo em conta a concentração de trabalho 0,65 µg/mL e volume de injeção de 25 µL

Os cromatogramas correspondentes à recta de calibração de dexametasona, obtidos a partir de soluções preparadas à concentração de 0,07 µg/mL, 0,14 µg/mL, 0,21 µg/mL, 0,28 µg/mL, 0,35 µg/mL, 0,42 µg/mL, 0,56 µg/mL (concentração de trabalho) e 0,83 µg/mL (gama de trabalho de 5% a 150%) encontram-se na figura abaixo.



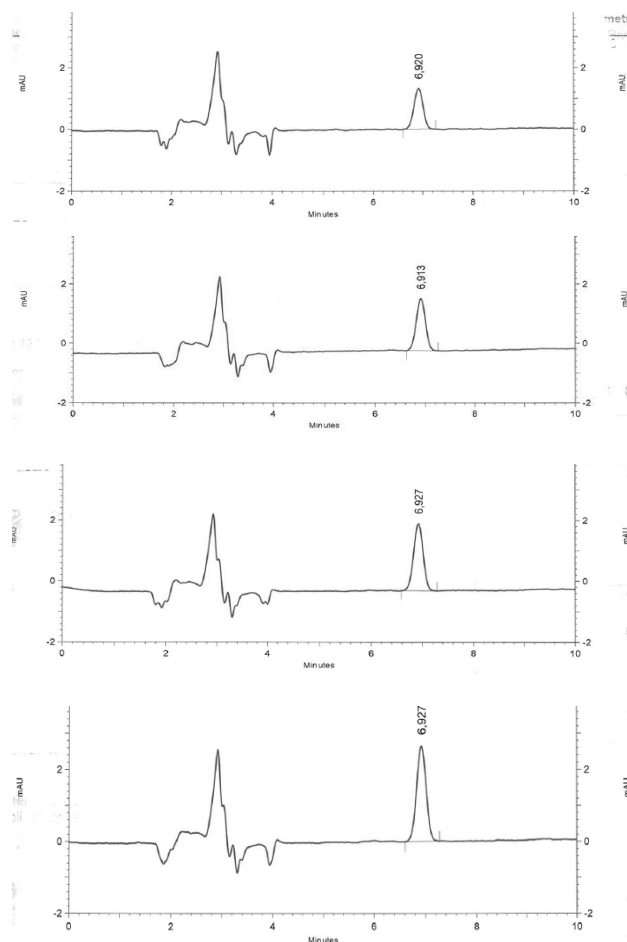


FIGURA 3.4 –Cromatogramas correspondentes às soluções de dexametasona, preparadas para o ensaio de linearidade. (Concentração de trabalho 0,56 µg/mL e volume de injeção de 25 µL)

Relativamente à aceitação da gama de trabalho, verificou-se que as diferenças das variâncias entre o ponto mais baixo de concentração e o mais alto, não são significativas. Deste modo, a gama de trabalho é aceite.

Quanto à linearidade, ficou também provado pelo estudo dos desvios residuais associados às variâncias, que a curva é de regressão linear. Para além disso, o laboratório estabeleceu como critério de aceitação da curva, que esta tenha uma correlação de 0,99, que também se verificou nas duas curvas.

Assim, as curvas de linearidade, apresentam-se adequadas na faixa de concentração estudada, obtendo-se um coeficiente de correlação para um modelo linear da curva média de $r^2=0,999$, com equação característica $Y= 164977,114x+599,805$ ($C= 0,56 \mu\text{g/mL}$) e $r^2=0,999$, com equação característica $Y= 170361,407x+4610,047$ ($C= 0,65 \mu\text{g/mL}$), onde Y representa o valor das áreas e X a concentração de dexametasona presente nas soluções expressas em $\mu\text{g/mL}$. A gama de trabalho linear fica estabelecida com uma faixa de concentrações de 0,07 $\mu\text{g/mL}$ a 0,83 $\mu\text{g/mL}$ (na concentração de trabalho 0,056 $\mu\text{g/mL}$) e 0,08 $\mu\text{g/mL}$ a 0,98 $\mu\text{g/mL}$ (na concentração de trabalho 0,065 $\mu\text{g/mL}$), ou seja, de 5% a 150%.

3.1.2.3 Limite de detecção

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método analítico foram calculados com base na equação da recta apresentada acima e nas equações previstas na regulamentação, contudo experimentalmente foram efectuados testes no sentido de se avaliar a robustez dos resultados obtidos teoricamente.

Segundo este método, o limite de detecção teórico, é dado pela equação 1.1 apresentada anteriormente

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{s}$$

em que, σ é o desvio padrão da intercepção da regressão linear com o eixo dos yy, obtido a partir da curva de calibração e s é o declive da curva de calibração, obtido a partir de amostras com concentrações em dexametasona na gama do limite de detecção.

De forma a comprovar que os valores de LOD e LOQ determinados através de cálculos teóricos era reproduzíveis na prática, procedeu-se à preparação de soluções de concentração igual e superior ao valor teórico obtido. Experimentalmente, verificou-se que a concentração estimada não era suficientemente robusta, pelo que foi validada uma outra concentração de valor superior (0,03 µg/mL), correspondente a 0,75ng de dexametasona.

TABELA 3.6 –Concentração de LOD e respectivas áreas

	C=0,56 µg/mL (⇔ 14 ng)	C=0,65 µg/mL (⇔ 16,25 ng)
Parâmetros	Resultados	Resultados
Conc. estimada (µg/mL) (equivalente em quantidade; ng)	0,01(⇔ 0,25 ng)	0,02(⇔ 0,5 ng)
Conc. validada (µg/mL) (equivalente em quantidade; ng)	0,03 (⇔ 0,75 ng)	0,03 (⇔ 0,75 ng)
Área (média), n=6	4507	2162

ng-nanograma; CV(%)- coeficiente de variação em %;(Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

Na Figura 3.5 apresenta-se um cromatograma correspondente ao nível de detecção.

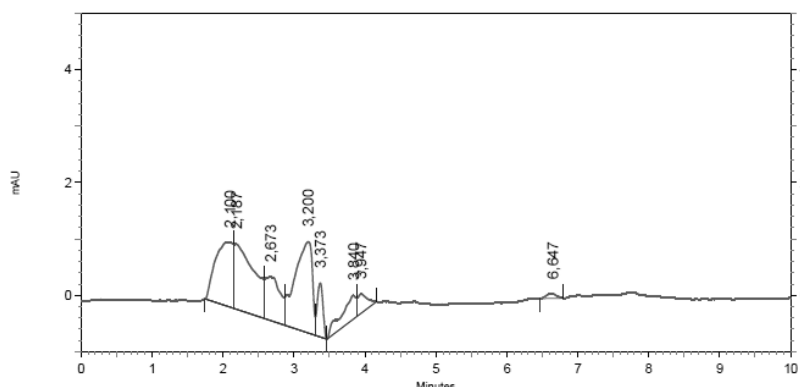


FIGURA 3.5 – Cromatograma correspondente a uma solução preparada à concentração de LOD 0,03 µg/mL, equivalente a 0,75ng de dexametasona.

3.1.2.4 Limite de Quantificação

Para a determinação do limite de quantificação (LOQ), utilizou-se teoricamente a seguinte equação 1.3 descrita anteriormente:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{s}$$

em que, σ é o desvio padrão da interceptação da regressão linear com o eixo dos yy, obtido a partir da curva de calibração e s é o declive da curva de calibração, obtido a partir de soluções padrão com concentrações em dexametasona na gama da linearidade.

Para confirmação experimental dos valores para o limite de quantificação, foi injectada seis vezes uma solução à concentração de 0,07 µg/mL e 0,08 µg/mL, correspondente a 1,75ng e 2ng de dexametasona, respectivamente. Os valores das áreas correspondentes e o CV em percentagem, encontram-se na Tabela 3.7.

TABELA 3.7 – Limite de quantificação

	C=0,56 µg/mL (⇔ 14 ng)	C=0,65 µg/mL (⇔ 16,25 ng)	
Parâmetros	Resultados	Resultados	Critério de Aceitação
Conc. estimada (µg/mL) (equivalente em quantidade, ng)	0,03 (⇔ 0,75 ng)	0,06 (⇔ 1,5 ng)	---
Conc. validada (µg/mL) (equivalente em quantidade, ng)	0,07 (⇔ 1,75 ng)	0,08 (⇔ 2 ng)	---
Área (média), n=6	10402	9609	---
CV (%)	3,94	2,96	≤ 15,0

ng-nanagrama; CV(%)- coeficiente de variação em %;(Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

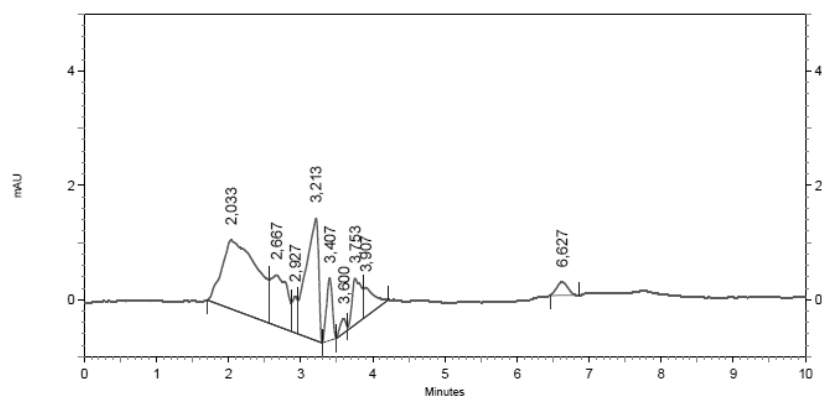


FIGURA 3.6 –Cromatograma correspondente a uma solução preparada à concentração de LOQ 0,08 $\mu\text{g/mL}$, equivalente a 2ng de Dexametasona.

Pelos cromatogramas apresentados nas figuras anteriores, é possível comprovar a capacidade do método de detectar e quantificar aos níveis definidos. Todas as amostras ao nível LOQ apresentam cromatogramas semelhantes ao apresentado.

3.1.2.5 Exatidão

Para avaliar a exactidão do método de determinação de resíduos de dexametasona procedeu-se à sobrecarga de placas aço inox e silicone, de modo a obter soluções com concentrações de dexametasona a nível LOQ, 100% e 150% e posteriormente compararam-se os valores obtidos com um padrão referência, na mesma gama de concentrações.

Os seus resultados obtidos estão agrupados nas Tabelas 3.8.

TABELA 3.8 –Exatidão

Nível	Conc. (µg/mL)		Recuperação (%)			Critério de Aceitação		
	Nominal	Conc. Recuperada	Individual	Média	CV (%)	Individual (R%)	Média (R%)	CV (%)
Placa Aço Inox								
LOQ (12,5%)	0,069	0,050	71,87	74,19	6,71	≥ 60%	≥ 60%	≤ 15,0
	0,069	0,055	79,90					
	0,069	0,049	70,79					
0,56µg/mL (100%)	0,555	0,438	79,02	84,57	5,69	≥ 70%	≥ 70%	≤ 10,0
	0,555	0,485	87,51					
	0,555	0,484	87,19					
0,83µg/mL (150%)	0.833	0.670	80,44	76,45	7,01	≥ 70%	≥ 70%	≤ 10,0
	0.833	0.586	70,36					
	0.833	0.655	78,55					
Placa Aço Inox								
LOQ (12,5%)	0,064	0,046	71,84	69,00	6,14	≥ 60%	≥ 60%	≤ 15,0
	0,064	0,046	71,03					
	0,064	0,041	64,14					
0,65µg/mL (100%)	0,644	0,586	91,01	89,19	3,11	≥ 70%	≥ 70%	≤ 10,0
	0,644	0,554	85,99					
	0,644	0,583	90,56					
0,98µg/mL (150%)	0,922	0,816	88,43	91,60	3,05	≥ 70%	≥ 70%	≤ 10,0
	0,922	0,864	93,70					
	0,922	0,855	92,68					
Placa Silicone								
LOQ (12,5%)	0,068	0,041	60,62	61,97	1,99	≥ 60%	≥ 60%	≤ 15,0
	0,068	0,043	63,05					
	0,068	0,043	62,26					
0,65µg/mL (100%)	0,644	0,568	88,20	87,35	0,92	≥ 70%	≥ 70%	≤ 10,0
	0,644	0,558	86,60					
	0,644	0,562	87,24					
0,98µg/mL (150%)	0,922	0,749	81,19	85,08	3,98	≥ 70%	≥ 70%	≤ 10,0
	0,922	0,806	87,37					
	0,922	0,800	86,68					

LOQ-limite de quantificação; R(%)-recuperação em %; CV(%)- coeficiente de variação em %;(Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

Os resíduos de dexametasona foram recuperados dos respectivos materiais (placa aço inox e silicone) por *swab*, com nível acima de 60 e 70% da quantidade teórica, o que demonstra que este resíduo pode ser efectivamente recuperado de ambos os materiais através

desta técnica. Além disso, o desvio padrão entre as recuperações esteve sempre muito abaixo do critério de aceitação ($\leq 10\%$ ou 15%), mostrando assim a consistência do teste.

Pela análise dos valores obtidos podemos afirmar que o método se considera validado em termos de exatidão para a determinação de resíduos de dexametasona.

3.1.2.6 Precisão

A precisão do método foi determinada através dos seguintes testes:

- Repetibilidade da injeção: comparação dos resultados obtidos em 6 injeções consecutivas da mesma solução (solução padrão de trabalho).
- Repetibilidade de análise: comparação dos resultados obtidos em 6 amostras individuais, efetuadas sob as mesmas condições.
- Precisão intermédia: comparação dos resultados obtidos em testes efectuados sob diferentes condições (outro analista e outro cromatógrafo, operando nas mesmas condições em dias diferentes).

a) Repetibilidade de sistema

A repetibilidade é avaliada através da análise do coeficiente de variação de um conjunto de réplicas consecutivas da mesma amostra. O método considera-se preciso em termos de repetibilidade se o coeficiente de variação for inferior a 5%. Neste caso efectuaram-se seis injeções consecutivas de uma solução padrão de trabalho a $0,56 \mu\text{g/mL}$ no mesmo dia, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista, e procedeu-se á análise do coeficiente de variação das áreas obtidas. A Tabela 3.9 apresenta os resultados de repetibilidade de sistema obtidos experimentalmente.

TABELA 3.9 – Repetibilidade de sistema

Parâmetros	Resultados	Resultados	Critério de Aceitação
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	0,56	0,65	---
Área (média), n=6	91578	100655	---
CV (%)	1,71	0,71	$\leq 5,0$
Rt (média) (min.)	6,89	6,62	---
CV (%)	0,04	0,09	---

CV(%)- coeficiente de variação em %;(Resultados obtidos para um volume de injeção $25 \mu\text{L}$)

De acordo com a percentagem de coeficiente de variação, pode considerar-se o método validado em termos de repetibilidade de sistema, uma vez que os valores obtidos são inferiores a 5%.

b) Repetibilidade de análise

Neste teste foram efectuadas seis análises da mesma amostra segundo o protocolo definido, pelo mesmo analista e utilizando as mesmas condições (mesmo sistema cromatográfico e mesma coluna cromatográfica). A repetibilidade de análise foi avaliada pela variabilidade de análise, expressa pelo coeficiente de variação de recuperação de seis replicados de amostras de limpeza. A Tabela 3.10 apresenta os resultados obtidos no ensaio de recuperação.

TABELA 3.10 – Repetibilidade de análise

Parâmetros	Resultados	Critério de Aceitação
Placas de Aço Inox (0,56 µg/mL)		
Doseamento (como % de recuperação)	79,02 87,51 87,19 87,65 86,78 86,39	R(%) ≥ 70%
Média	85,76	R(%) ≥ 70%
CV (%)	3,89	≤ 10,0
Placas de Aço Inox (0,65 µg/mL)		
Doseamento (como % de recuperação)	91,01 85,99 90,56 93,22 91,13 88,85	R(%) ≥ 70%
Média	90,13	R(%) ≥ 70%
CV (%)	2,73	≤ 10,0
Placas de Silicone (0,65 µg/mL)		
Doseamento (como % de recuperação)	88,20 86,60 87,24 86,36 85,67 88,98	R(%) ≥ 70%
Média	87,18	R(%) ≥ 70%
CV (%)	1,41	≤ 10,0

R(%)-recuperação em %; CV(%)- coeficiente de variação em %;(Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

O critério de aceitação da recuperação ao nível 100% para este método analítico, de acordo com a tabela 1.10, é de ≥70% para valores individuais. Deste modo, a recuperação obtida nas 3 condições, encontra-se dentro dos critérios aceitáveis.

a) Precisão intermédia

Para estudar a precisão intermédia do método foram realizadas análises de amostras de limpeza preparadas a 100%, tendo sido avaliado o coeficiente de variação decorrente da injeção de seis replicados à mesma concentração de dexametasona. A precisão intermédia do método foi efectuada por comparação dos resultados obtidos ($D\%$ = diferença) por analistas diferentes operando sob condições diferentes (sistema cromatográfico e coluna diferentes).

O método considera-se preciso em termos de precisão intermédia, se o coeficiente de variação obtido for inferior a 20%. As equações utilizadas para efectuar os cálculos necessários estão descritas no capítulo anterior (equação 1.8, 1.9 e 1.10).

TABELA 3.11 – Precisão Intermédia

Parâmetros	Resultados		Critério de Aceitação
	Teste I	Teste II	
Placas de Aço Inox (0,56 µg/mL)			
Doseamento (como % de recuperação)	80,23	92,56	D(%) ≤ 20,0 CV(%) ≤ 15,0
	88,86	97,05	
	88,54	95,77	
	89,00	97,55	
	88,12	94,71	
	87,72	95,75	
Média	87,08	95,57	
CV (%)	3,89	1,87	
Diferença entre testes (%)	8,49		
CV combinado (%)	2,97		
Placas de Aço Inox (0,65 µg/mL)			
Doseamento (como % de recuperação)	92,41	88,00	D(%) ≤ 20,0 CV(%) ≤ 15,0
	87,32	95,64	
	91,95	91,39	
	94,65	90,94	
	92,54	88,05	
	90,22	92,87	
Média	91,52	91,15	
CV (%)	2,73	3,21	
Diferença entre testes (%)	0,37		
CV combinado (%)	2,98		
Placas de Silicone (0,65 µg/mL)			
Doseamento (como % de recuperação)	89,56	93,37	D(%) ≤ 20,0 CV(%) ≤ 15,0
	87,94	91,00	
	88,58	93,19	
	87,69	93,80	
	86,99	87,75	
	90,36	93,99	
Média	88,52	92,18	
CV (%)	1,41	2,63	
Diferença entre testes (%)	3,66		
CV combinado (%)	2,14		

$D(\%)$ - diferença em %; $CV(\%)$ - coeficiente de variação em %;(Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

De acordo com os resultados apresentados é evidente que tanto em condições de repetibilidade de sistema como de reprodutibilidade, o método responde dentro dos critérios de aceitação estabelecidos. Mais uma vez, e lembrando a importância do operador quanto a alterações no método, por este estudo, é evidente a não influência do mesmo na execução do método analítico.

3.1.2.7 Estabilidade

Este ensaio permite determinar o período o período de tempo no qual as amostras podem ser mantidas na bancada do laboratório, no frigorífico e no auto-injector do HPLC sem sofrerem degradação significativa. A estabilidade das soluções foi verificada estatisticamente pela análise de um factor onde se verifica a influência do factor tempo e o coeficiente de variação (CV%).

Estabilidade da solução padrão

- **Na bancada, no frigorífico e no injector**

A solução padrão a 100% foi mantida à temperatura ambiente do laboratório (20°C – 24°C\40% HR – 60% HR), durante 72h. As amostras são injectadas, em duplicado, em diferentes intervalos de tempo (24h, 48h e 72h) depois da preparação. Na tabela 3.12 apenas se apresentam os resultados relativos ao tempo de estabilidade analisado às 0h e 72h.

TABELA 3.12 – Estabilidade de Soluções em placa aço inox e silicone

1) Aço inox (0,56 µg/mL)

Solução	Ci (µg/mL)(t=0 h)	Cf (µg/mL) (t=72 h)	Variação (%)	Critério de Aceitação
A 20-24°C, não protegidas da luz durante 3 dias				
Referência (0,56 µg/mL)	0,534	0,560	4,86	≤ 20,0%
Amostra recolhida placa aço inox (0,56 µg/mL)	0,407	0,420	3,02	
A 5°C, protegida da luz durante 3 dias				
Referência (0,56 µg/mL)	0,534	0,560	4,93	≤ 20,0%
Amostra recolhida placa aço inox (0,56 µg/mL)	0,407	0,416	2,05	
No injector, protegida da luz durante 3 dias				
Referência (0,56 µg/mL)	0,534	0,556	4,26	≤ 20,0%
Amostra recolhida placa aço inox (0,56 µg/mL)	0,407	0,422	3,51	

Ci-concentração inicial; Cf-concentração final; (Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

2) Aço inox e silicone (0,65 µg/mL)

Solução	Ci (µg/mL)	Cf (µg/mL)	Variação (%)	Critério de Aceitação
A 20-24°C, não protegidas da luz durante 3 dias				
Referência (0,65 µg/mL)	0,645	0,631	2,22	≤ 20,0%
Amostra recolhida placa aço inox (0,65 µg/mL)	0,588	0,587	0,30	
Amostra recolhida placa silicone (0,65 µg/mL)	0,556	0,552	0,80	
A 5°C, protegida da luz durante 3 dias				
Referência (0,65 µg/mL)	0,645	0,637	1,28	≤ 20,0%
Amostra recolhida placa aço inox (0,65 µg/mL)	0,588	0,585	0,60	
Amostra recolhida placa silicone (0,65 µg/mL)	0,556	0,552	0,67	
No injector, protegida da luz durante 3 dias				
Referência (0,65 µg/mL)	0,645	0,633	1,95	≤ 20,0%
Amostra recolhida placa aço inox (0,65 µg/mL)	0,588	0,578	1,70	
Amostra recolhida placa silicone (0,65 µg/mL)	0,556	0,540	2,82	

Ci-concentração inicial; Cf-concentração final; (Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

TABELA 3.13 – Estabilidade em placas à temperatura ambiente, protegidas da luz durante 3 dias

Placa	Conc. (µg/mL)		Recuperação (%)			Critério de Aceitação	
	Nominal	Conc. Recuperada	Individual	Média	CV (%)	Individual (R%)	Média (R%)
Aço Inox 0,56 µg/mL	0,589	0,420	71,29	73,97	5,13	≥ 70%	≥ 70%
	0,589	0,452	76,65				
Aço Inox 0,65 µg/mL	0,644	0,544	84,51	83,25	2,14	≥ 70%	≥ 70%
	0,644	0,528	81,99				
Silicone	0,644	0,478	74,28	74,43	0,29	≥ 70%	≥ 70%
	0,644	0,480	74,59				

CV-coeficiente de variação; R%- Recuperação em %; (Resultados obtidos para um volume de injeção 25 µL)

Analisando as tabelas anteriores, verifica-se que o tempo que medeia entre a preparação da amostra e a sua injeção não vai influenciar os resultados, pelo que se conclui que a amostra é estável. Relativamente ao estudo de estabilidade em placas, verifica-se que o

equipamento poderá permanecer sujo durante, pelo menos 3 dias, sem que ocorra o problema de uma débil recuperação.

3.1.2.8 Testes de *System Suitability*

O teste de *system suitability* foi feito de modo a assegurar que tanto a metodologia como o equipamento estão de acordo com as expectativas de análise de amostras. A Tabela 3.14 apresenta os resultados para o *system suitability* determinado de acordo com a Farmacopeia Europeia.

TABELA 3.14 – Testes de *system suitability*

Parâmetros ^(a) (Dexametasona a 0,56 µg/mL)	Resultados	Valores Recomendados
Eficiência	6703	≥ 2000 ^(b)
Assimetria do pico	0,99	0,8 – 1,5 ^(b)
Precisão das injecções de replicado – CV(%), n ≥ 6 ^(c)	1,71	≤ 5,0%

(a) Determinado de acordo com a Farmacopeia Europeia

(b) Recomendações da Farmacopeia Europeia e CDER (FDA), *Validation of Chromatographic Methods*

(c) Dados da repetibilidade de sistema

3.1.3 Avaliação da limpeza de equipamentos (Recolha de amostras)

Face às necessidades do cliente, o LEF direcciona as suas produções no sentido de corresponder aos pedidos exigidos no momento. Este facto resultou na maior dificuldade encontrada no desenvolvimento deste trabalho, que foi a impossibilidade até ao momento da realização de três corridas de validação do processo de limpeza. Por este motivo apenas serão apresentados resultados relativos a uma corrida, isto é, resultados obtidos após o encerramento da produção de um lote de comprimidos de dexametasona.

Todos os equipamentos envolvidos no processo foram aprovados no critério de “visualmente limpo”, isto é, não se observou a olho nu a presença de quaisquer resíduos do medicamento.

Após o procedimento de limpeza foi realizada a amostragem para verificação da quantidade de resíduos de dexametasona. Estas amostragens foram realizadas com *swab* em 25cm² na superfície dos pontos seleccionados no ponto 2.1.1.1 b) e 2.1.1.2 b). Conforme o ensaio de recuperação descrito no ponto 3.1.1 c), foram utilizados dois *swabs* (molhados) por ponto de amostragem para o material em aço inox e 1 *swab* (molhado) para o silicone.

As Tabelas 3.15 e 3.16 detalham as concentrações, obtidas em cada um dos pontos amostrados dos equipamentos. É importante referir que todos os valores reportados nas tabelas seguintes, foram corrigidos com um factor de recuperação determinado aquando do ensaio de exatidão, resultante da média de todos os resultados de recuperação obtidos. (Ver tabelas 3.8)

TABELA 3.15 Resultados obtidos após recolha de amostras do Misturador em V

Equipamento	Ponto de Recolha	Concentração (µg/mL)
Misturador em V Filtro FTMV-08	Ponto A (Anel de descarga)	< LOQ
	Ponto B (Tampas de silicone)	< LOQ
	Ponto C (Friso da tampa de descarga)	< LOQ

TABELA 3.16 - Resultados obtidos após recolha de amostras na Máquina de Comprimir

Equipamento	Ponto de Recolha	Concentração (µg/mL)
Máquina de Comprimir RIVA PICCOLA	Ponto A (Estrela)	< LOQ
	Ponto B (Cavidade das matrizes)	< LOQ
	Ponto C (Anel de ligação da tremonha ao distribuidor)	< LOQ
	Ponto D (Raspadores do distribuído)	< LOQ
	Ponto E (Prato)	0,273

LOQ- Limite de quantificação

As figuras 3.6 e 3.7, mostram uma representação gráfica dos resultados apresentados anteriormente, onde é possível perceber que todas as soluções analisadas apresentam resíduos com valores muito abaixo do limite especificado.

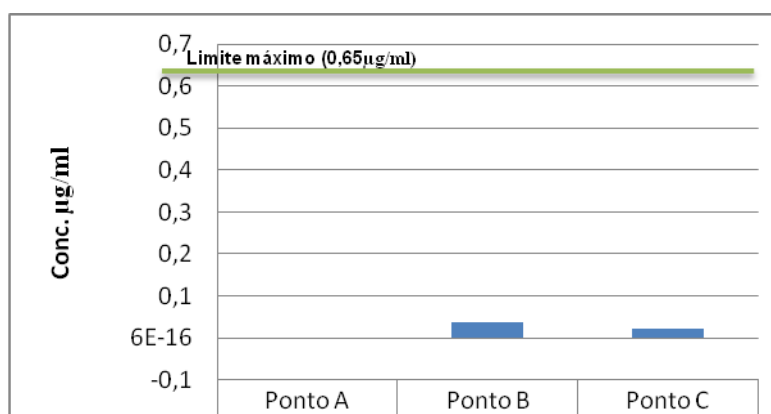


FIGURA 3.7- Resíduos de dexametasona por amostra recolhida, após o procedimento de limpeza do Misturador em V

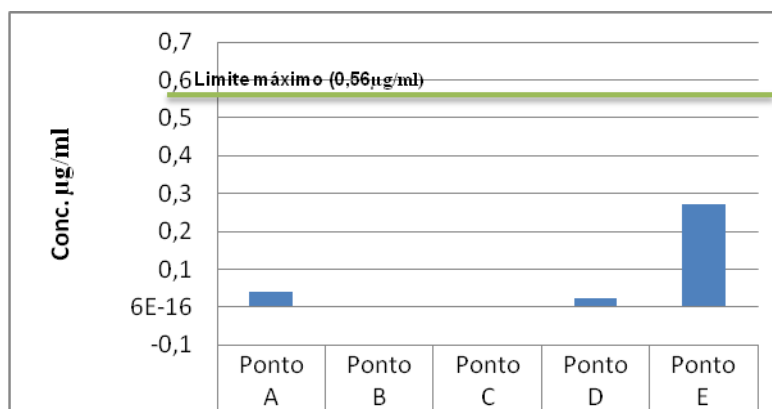


FIGURA 3.8-Resíduos de dexametasona por amostra recolhida, após o procedimento de limpeza da máquina de comprimir

A informação a ter em conta para avaliar o significado dos níveis residuais de dexametasona encontrados em amostras após o procedimento de limpeza dos equipamentos, é que a menor concentração de dexametasona capaz de ainda promover alguma actividade farmacológica num indivíduo normal é igual a 0,56 µg/mL ou 0,65 µg/mL, consoante o equipamento. Baseado nestas informações e observando os gráficos anteriores, verifica-se que a maior concentração encontrada nas amostras recolhidas foi de 0,273 µg/mL (Ponto E), o que poderá ser indicativo de um ponto no equipamento que requer especial atenção, aquando da sua limpeza. É contudo importante realçar que apesar deste valor se encontrar acima do LOQ estabelecido, apresenta uma distância muito considerável do limite máximo admissível, o que nos permite assegurar confiança no processo de limpeza efectuado.

Deste modo, os níveis residuais da substância activa após a limpeza dos equipamentos, cumprem os critérios de aceitação aqui apresentados, confirmando que os valores encontrados são muito menores que a menor concentração capaz de causar acção farmacológica.

3.1.4 Resultados obtidos por determinação de carbono orgânico total (TOC)

O carbono orgânico total (TOC) é um método aceite pela FDA (www.fda.gov) que avalia a contribuição de compostos de carbono em amostras, garantindo a confiança de que determinado equipamento pode ser limpo abaixo dos critérios estabelecidos. Em 1996, o ICH com a assistência do FDA (CDER & CBER), criaram o documento de normas “*Q2B-Validation of Analytical Procedures*”. O objectivo deste documento consistiu em direccionar as companhias farmacêuticas a considerar características específicas durante a validação de métodos analíticos com aplicação em validações de limpeza. Estas notas foram reforçadas no documento Q2B, fornecendo vários exemplos dos seguintes parâmetros relacionados com a validação de método por TOC:

- Limites de detecção e quantificação

- Determinação de exactidão e precisão
- Linearidade e percentagem de recuperação
- Robustez do método analítico

(Guidance for industry Q2B: Validation of Analytical Procedures. Methodology. November 1996. ICH, FDA, CDER, CBER)

A determinação de carbono orgânico total (TOC) foi escolhida neste trabalho, por ser uma técnica não específica permitindo assim quantificar os resíduos de agente de limpeza após o procedimento de limpeza. Apesar de não específica, a determinação de TOC possui elevada sensibilidade, rápido tempo de determinação e baixo custo, quando comparada a outros métodos. Contudo, é mais uma vez importante realçar que a determinação de TOC é considerada para a validação de limpeza, como uma técnica que avalia um “pior caso” já que o resultado da determinação é considerado como proveniente apenas do agente de limpeza, apesar do real ser uma mistura de todos os resíduos que possuem carbono orgânico na amostra.

O aparelho de carbono orgânico total foi devidamente calibrado e qualificado antes da análise das soluções amostra (laboratório externo).

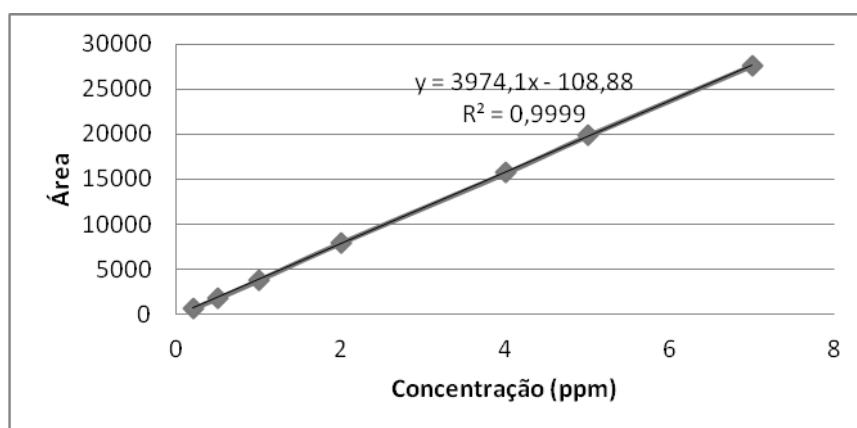


FIGURA 3.9 - Curva de calibração do aparelho de TOC (Carbono Orgânico Total)

A equação expressa na representação gráfica acima, representa a linearidade do método analítico para a determinação das concentrações associadas a cada uma das amostras em questão.

a) Avaliação dos resíduos de agente de limpeza através de método de enxaguamento

Neste trabalho, que se trata de uma abordagem inicial à avaliação da limpeza de equipamentos utilizando a metodologia de carbono orgânico total (TOC), foi adoptado o critério de aceitação de 10ppm de TOC para amostras de enxaguamento. O procedimento de limpeza foi executado no final da produção do lote piloto, tal como referido no capítulo anterior. A técnica de amostragem utilizada foi a recolha de água de enxaguamento ou água de lavagem

que se faz recolhendo uma porção do fluido (250mL) usado na última operação do procedimento de limpeza do equipamento e logo após submetê-la à análise. O Misturador em V foi o equipamento avaliado através desta amostragem.

Antes de realizar a amostragem o frasco para onde foi recolhida a amostra, foi sujeito a um tratamento prévio para remoção de carbonos, evitando assim interferentes no valor de TOC.

Para os resíduos de agente de limpeza, o limite encontrado mais criterioso foi de 3,333 mg/amostra de detergente, dado calculado pelo critério que considera o limite de aceitação de 10ppm do produto contaminante no produto subsequente. Assim, o resíduo de agente de limpeza máximo permitido é de 13,3 µg/mL de detergente P3-COSA Pur 80 para amostras de água de enxaguamento.

A Figura 3.10 mostra os resultados obtidos no ensaio de linearidade, efectuado com diferentes concentrações de agente de limpeza. Esta metodologia analítica promoveu uma medida correlacionável a uma concentração do contaminante.

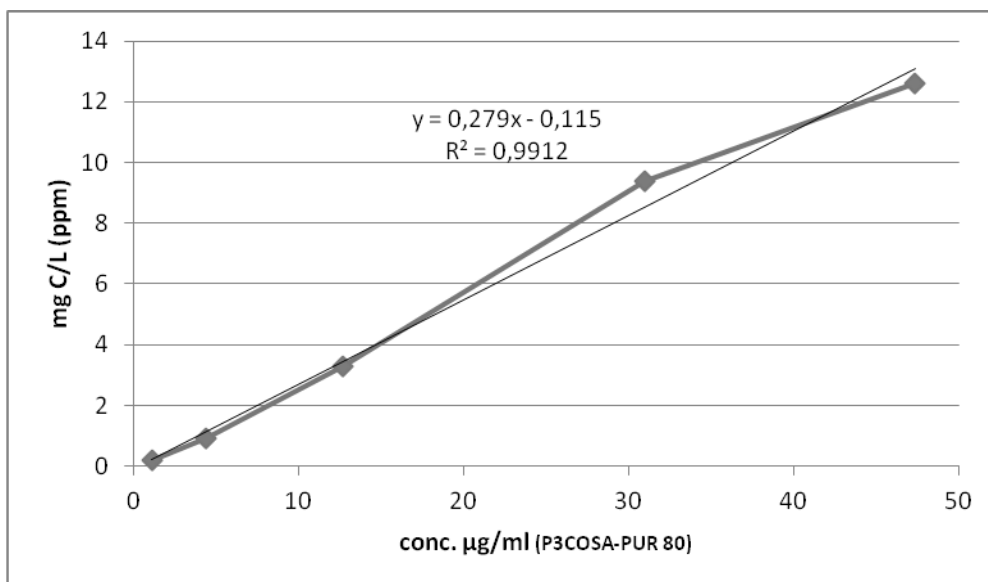


FIGURA 3.10 - Gráfico de concentração de agente de limpeza versus mg C/L (TOC)

As variáveis apresentaram respostas lineares com um coeficiente de determinação para um modelo linear de $r^2 = 0,99$ e equação $y = 0,279x - 0,115$ onde y representa as medidas de carbono (mg C/L) e x a concentração de agente de limpeza expressa em µg/mL. Através da equação da recta obtida, os limites calculados anteriormente foram transformados de concentração de detergente (µg/mL) para quantidade de carbonos (mg C/L), conforme Tabela 3.17

TABELA 3.17- Conversão do critério calculado

Critério	Amostragem
	Água enxaguamento
10ppm	13,3 µg/mL (agente de limpeza) = 3,60mg C/L (TOC)

Assim, o limite de resíduo de agente de limpeza calculado como critério de aceitação para a validação de limpeza do Misturador em V, utilizado na preparação de comprimidos de dexametasona é de 3,60mg C/L para amostras de enxaguamento.

A Tabela 3.18 mostra os resultados obtidos em termos de concentração de carbonos, face às respectivas soluções de agente de limpeza. Esta análise corresponde a um ensaio de precisão, onde foram analisadas seis soluções previamente preparadas a uma concentração correspondente ao “pior caso” ($C=33,3 \mu\text{g/mL}$). As seis soluções stock inicialmente preparadas, foram igualmente analisadas, no sentido de avaliar possíveis contribuições de carbonos provenientes de outros contaminantes que não o agente de limpeza em questão. Cada resultado obtido pela análise de TOC, é denominado de “concentração real”. Este valor foi corrigido pela medida do branco (solvente) que corresponde à análise da água utilizada nas diluições da solução *stock*.

TABELA 3.18 - Precisão

	Quantidade (mg)	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. teórica (mg C/L)	Conc. real (mg C/L)	Conc. real - Solvente (mg C/L)	Média
Solvente água	-	-	-	0,7	-	
Solução stock: 333 µg/mL	41,68 40,94 40,46 32,60 35,86 39,40	416,8 409,4 404,6 326,0 358,6 394,0	109,9 108,0 106,7 86,0 94,6 103,9	170,0 160,0 220,0 170,0 140,0 170,0	169,3 159,3 219,3 169,3 139,3 169,3	171,0
Solução diluída: 33,3 µg/mL	-	37,89 37,22 36,87 35,82 32,6 29,64	9,9 9,7 9,6 9,3 8,5 7,7	19,0 15,0 15,0 17,0 14,0 13,0	18,3 14,3 14,3 16,3 13,3 12,3	14,8

Concluindo relativamente ao ensaio de precisão (seis replicados de concentração 333 µg/mL e seis replicados de concentração 33,3 µg/mL), verificamos que os valores encontrados asseguram consistência no método apresentado. Estes resultados preliminares poderão servir de base para a definição de critérios de aceitação para futuras análises de amostras de enxaguamento, analisadas por TOC.

A partir da equação obtida no ensaio de linearidade é possível converter os valores teóricos das soluções de agente de limpeza preparadas, em quantidade de carbonos (mg C/L), e assim fazer uma estimativa da possível quantidade de carbonos provenientes de outras fontes de contaminação.

TABELA 3.19 – Recuperação em soluções de agente de limpeza

Parâmetros	Resultados	Critério de Aceitação
Agente de limpeza (33,3 µg/mL)		
Recuperação (%)	184,8	-
	147,4	
	149,0	
	175,3	
	156,5	
	159,7	
Média	162,1	-
CV (%)	10,8	-

Os valores de recuperação obtidos são bastante superiores a 100%, os quais confirmam a presença de outras fontes de carbono para além do agente de limpeza. Contudo, tais contribuições não alteram os resultados de modo significativo, pelo que se pode propor este método para a análise de amostras cuja amostragem seja efectuada por enxaguamento.

3.1.5 Avaliação da limpeza de agente de limpeza - Recolha de amostras no Misturador em V

No sentido de avaliar a eficácia do método proposto para análise de amostras obtidas por enxaguamento, foi recolhida uma amostra após ter sido efectuado o procedimento de limpeza descrito no capítulo anterior para o equipamento misturador em V após a produção de comprimidos de dexametasona. Foi assim recolhida uma amostra com um volume de 250mL da última água de enxaguamento, e foi submetida a análise de TOC.

TABELA 3.20 – Resultado obtido numa amostra de enxaguamento recolhida no equipamento Misturador em V

	Conc. obtida (mg C/L)	Conc. real (mg C/L)
Solvente água	<0,2	-
Amostra de enxaguamento	1,2	±1,0

Conc. Real=Conc. amostra – Conc. Solvente

A informação a ter em conta para avaliar o significado dos níveis residuais de agente de limpeza encontrados na amostra de enxaguamento após o procedimento de limpeza, é que a menor concentração de agente de limpeza capaz de ainda promover alguma actividade farmacológica num indivíduo normal é igual a 13,3 µg/mL (de agente de limpeza) ou 3,60mg C/L. Baseado nesta informação e observando o resultado da tabela anterior, verifica-se a amostra recolhida apenas apresenta 1,2mgC/L, relativamente abaixo do limite máximo admissível.

Deste modo, os níveis residuais de agente de limpeza, cumprem os limites aqui apresentados, confirmando que a metodologia apresentada poderá ser aplicada à problemática em questão.

4. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu concluir que:

- A substância activa dexametasona foi seleccionada como “pior caso” para a validação do processo de limpeza do Misturador em V e Máquina de Comprimir (equipamentos multiuso), por possuir menor solubilidade e maior toxicidade, quando comparado com outros activos também utilizados nestes equipamentos.
- Os ensaios de recuperação mostram que a substância activa dexametasona pode ser removida de forma efectiva da superfície de aço inox (AISI 316) e silicone, uma vez que apresentou valores de recuperação superiores a 70%, conforme o critério de aceitação especificado (ensaio de precisão).
- A metodologia testada para a quantificação de resíduos de dexametasona, considera-se validada, uma vez que satisfaz as especificações determinadas para cada um dos parâmetros de validação testados. Foi ainda verificada a estabilidade da solução padrão e da solução amostra durante 3 dias na bancada, no injector do HPLC e no frigorífico, verificando-se que o factor tempo não influi na estabilidade das soluções, pois os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 20,0%, pelo que se pode confirmar a estabilidade das soluções neste período de tempo.
- Todas as análises realizadas para resíduo de substância activa apresentaram resultados inferiores a 0,65 µg/mL para amostras de *swab* recolhidas no Misturador em V (superfícies em aço inox e silicone) e 0,56 µg/mL para amostras de *swab* recolhidas na Máquina de Comprimir, permanecendo assim dentro dos parâmetros aceitáveis.
- Através de método HPLC foi possível quantificar, após a limpeza, os níveis residuais de Dexametasona presentes nos equipamentos Misturador em V e Máquina de comprimir. Tais níveis de concentração cumpriram os requisitos dos critérios de aceitação de visualmente limpos e inferiores a 0,56 µg/mL e 0,65 µg/mL, respectivamente, limite calculado do produto dexametasona no produto subsequente.
- Pode-se comprovar que os níveis residuais de dexametasona e agente de limpeza ainda presentes nos equipamentos ou transferidos para o produto subsequente estiveram em concentrações inferiores à menor concentração do fármaco capaz de provocar qualquer acção terapêutica.
- De acordo com os resultados obtidos dentro dos limites especificados considera-se aprovada a validação do processo de limpeza manual deste tipo de equipamentos multiuso, utilizado para produção de comprimidos de dexametasona. É importante

sublinhar que a metodologia desenvolvida foi específica para esta validação, necessitando assim de adaptações para a sua utilização noutros equipamentos.

- Esta validação de limpeza gera a confiança de que os equipamentos usados para a produção de comprimidos de dexametasona, são limpos de forma adequada e eficaz removendo os resíduos de substância activa e agente de limpeza até um nível aceitável calculado com base científica. Com isto há a garantia e segurança na qualidade dos produtos fabricados uma vez que se exclui a possibilidade de contaminação cruzada.
- A estratégia apresentada para validação da limpeza mostrou-se simples, rápida e eficaz podendo ser aplicada para outras formas farmacêuticas. Deste modo, esta validação traz o benefício de aumento de produção industrial já que um mesmo equipamento pode ser utilizado para produção de vários tipos de produtos.
- O estudo preliminar para a determinação de resíduos de agente de limpeza (P3 COSA Pur 80) apresentou resultados inferiores ao limite máximo permitido, para a amostra de enxaguamento, recolhida após a produção e limpeza de um lote piloto de comprimidos de dexametasona. Apesar dos resíduos de agente de limpeza analisados apresentarem valores dentro do especificado, não são valores que correspondam apenas ao detergente. A determinação de TOC, por ser um método não específico, é considerada um “pior caso”, pois os resultados encontrados possuem outras contribuições. Contudo, testes preliminares permitiram concluir que através desta técnica conseguiremos obter um método linear e robusto, o que nos dá algumas garantias de uma boa validação do agente de limpeza.
- Este trabalho reflectiu uma problemática específica da indústria farmacêutica (LEF), representando um exemplo de aproximação entre a universidade e o sector empresarial.

4.2 Sugestões

- Avaliar a possibilidade de aplicação da metodologia de validação proposta noutros processos de limpeza realizados em diferentes equipamentos existentes no LEF.
- Quantificar os resíduos de agente de limpeza e de substância activa, após a produção de mais dois lotes piloto, de modo a concluir o relatório de validação.
- Realizar um novo estudo onde devem ser validados dois *holding times* diferentes: após o final de produção e o início da limpeza (*holding time* de sujo) e após o final da limpeza e o início de nova produção (*holding time* de limpo)
- Utilizar a análise de carbono Orgânico total (TOC) para quantificar os resíduos de agente de limpeza com amostragem tanto por *swab* como por enxaguamento.
- Neste momento está em discussão na EMA (*European Medicines Agency*) uma nova forma de calcular os critérios de aceitação, com base apenas na actividade farmacológica e toxicológica dos APIs. É ainda expectável um esclarecimento, no que diz respeito ao modo de proceder com substâncias altamente tóxicas. No futuro será importante reflectir sobre esta nova abordagem.

BIBLIOGRAFIA

- ATHAIDE, A. *Validação comprova e documenta qualidade dos produtos equipamentos. Controle de Contaminação* 2000;16-22.
- BELELLI, D, Lambert L. *Neurosteroids: endogenous regulators of the GABAA receptor.* Nature Rev Neurosci 2005; 6:565-575.
- BERG, M, Tymoczko L, Stryer L. *Biochemistry*. 6th ed. New York, W.H. Freeman and Company, 2007
- CIVIALE, C, Bucaria F, Piazza S, Perl O, Miano F, Enea V. *Ocular permeability screening of dexamethasone esters through combined cellular and tissue systems.* J Ocul Pharmacol and Therapeutics 2004; 20-(1):75-84.
- Cleaning Validation Swabs. Disponível em: <http://www.texwipe.com/products/swabs/cleaning-validation.aspx>
- Cross, P, Paul I, Goldman D. *Single-dose dexamethasone for mild-to-moderate asthma exacerbations: effective, easy, and acceptable.* Can Fam Physician 2011; 57-(10):1134-6.
- Donald J Abraham. *Burger's Medicinal Chemistry*, 6th ed, Wiley, 2003
- EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, *Guideline on Validation of Analytical Procedures.* Disponível em: <http://www.edqm.eu/en/EDQM-Downloads-527.html>
- Ermer, J, Miller M. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice.* WILEY-VCH, Weinheim, 2005
- European Pharmacopoeia, General Chapters <2.2.46>, *Chromatographic Separations Techniques*
- Farmacopeia Portuguesa 9.0, Monografias A-Z, 2318-2319
- FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods* (1994). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM134409.pdf>
- FDA, *Current Good Manufacturing Practices Regulations for Finished Pharmaceuticals*, 21 CFR (Code of Federal Regulations). Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRPart=211>

- FDA, *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation*. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/methval.pdf>.
- FDA, Office of Regulatory Affairs. *Guide to Inspections Validation of Cleaning Processes*. Disponível em: www.fda.gov/ora/inspect_ref/igs/valid.html.
- Fourman, L, Mullen V. *Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations*. Pharmaceutical Technology 1993; 17-(4): 54-56.
- Furlong, J, Booth B, Wallace B. *Selection of a TOC Analyzer: Analytical Considerations*. Application Note (Tekmar-Dohrmann) 1997.
- Gasior, M, Carter B, Witkin M. *Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders*. Trends in Pharm. Sci. 1999; 20:107-112.
- GMP, *Manufacture of Sterile Medicinal Product*. Disponível em: http://www.gmp-compliance.org/eca_guideline_120.html
- Hanson, R, *Steroids: partial synthesis in medicinal chemistry*. Department of Chemistry, University of Sussex, Brighton, Sussex, UK. 2010; 27-(6):887-99.
- Hardman J, Limbird L, Hardman J, Limbird L. *The Pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed, McGrawHill 2001;1655-1673.
- Hoffmann, J, Sommer A. *Steroidhormone receptors as targets for the therapy of breast and prostate cancer-recent advances, mechanisms of resistance, and new approaches*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2005; 93:191-200.
- ICH Q2A: *Text on Validation of Analytical Procedures* (1995)
- ICH Q2B: *Validation of Analytical Procedures: Methodology* (1997)
- ICH Q2R1: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2005)
- ICH Q7: *Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients* (2000)
- INFARMED, Testemunho, nº11, Dezembro 2009. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/GENERICOS/ARTIGOS_OPINIAO/TESTEMUNHO_11_Nº11_2009.pdf

- Klassen C, Casarett & Doull's, *Toxicology The basic science of poisons*, 6th ed, McGraw-Hill 2001
- Klassen, P, Sutcliffe T, Watters K, Wells A. *Dexamethasone in salbutamol-treated in patients with acute bronchiolitis: A randomized, controlled trial*. The Journal of Pediatrics 1997; 130-(2).
- LeBlanc, A, *Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing*, Interpharm/CRC, USA, 2000
- LeBlanc, A. *Establishing Scientifically Justified Acceptance Criteria for Cleaning Validation of Finished Drug Products*. Pharmaceutical Technology 1998; 22-(10):136-148.
- LeBlanc, A. *Rinse Sampling for Cleaning Validation Studies*. Pharmaceutical Technology 1998; 22-(5):66-74.
- Lednicer Daniel. *Strategies for Organic Drug Synthesis and Design*, 1st ed., 2009
- Lee, S, Chang L. *Cytotoxic Natural Products from Formosan Plants and Marine Organisms*. Curr. Med. Chem. 2004; 11:1461-1477.
- Lemke L, Williams A, Roche F, Zito W. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7th ed, Lippincott Williams & Wilkins 2012. Capítulos 25, 28, 29 e 31.
- Martindale 37th ed., 2011: *The Complete Drug Reference* (2005), Palavra-chave: Dexamethasone (monograph)
- Miller, M. Comparison of Combustion versus UV/Persulfate TOC Analysis. Application Note (Tekmar-Dohrmann) 1997; 7(2).
- MOHAN, N, Gupta V, Tandon R, Gupta K, Vajpayee R. *Topical ciprofloxacin-dexamethasone combination therapy after cataract surgery*. J Cataract Refract Surg 2001; 27.
- Nussbaumer P, Billich A. *Steroid Sulfatase Inhibitors*. Med. Res. Rev. 2004; 24:529-576.
- OMS, Technical Report Series No. 937 Annex 4 - OMS Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Geneva, 2006. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_937_eng.pdf
- Orr R, Singh F. *The Anabolic Androgenic Steroid Oxandrolone in the Treatment of Wasting and Catabolic Disorders. Review of Efficacy and Safety*, Drugs 2004; 64:725-750.

- Schroepfer, J. *Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes*.
Physiol. Rev. 2000; 80:361-554.
- Séralini E, Moslemi S. *Aromatase inhibitors: past, present and future*. Mol.Cell.
Endocrinol. 2001; 178:117-131.
- Site: TOXNET; Palavra-chave: Dexamethasone
- Tamella T. *Endocrine treatment of prostate cancer*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.
2004; 92: 287-295.
- United States Pharmacopeia, General Chapters <621>, *Chromatography*
- United States Pharmacopoeia, General Chapters <1225>, *Validation of Compendial
Methods*
- Virtanen, E, Kolehmainen E. *Use of Bile Acids in Pharmacological and Supramolecular
Applications*. Eur. J. Org. Chem. 2004; 3385-3399.
- Yang P, Burson K, Feder D, Macdonald F. *Method Development of Swab Sampling for
Cleaning Validation of a Residual active Pharmaceutical Ingredient*,
Pharmaceutical Technology, 2005.